

**CAROLINE VALENTE**

**Efeito do estresse pelo frio sobre células  
embriogênicas de *Araucaria angustifolia* em cultura:  
disfunção mitocondrial e estresse oxidativo**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de doutor em Ciências – Bioquímica.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Silvia Maria Suter Correia Cadena.

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eva Gunilla Skare Carnieri.

Colaboradora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Birgit Arnholdt-Schmitt.

Curitiba

2012

Dedico este trabalho aos meus pais Hamilton e Rosili pelo carinho e pelo apoio irrestrito, incondicional e de todas as ordens, ao longo dessa e de todas as minhas caminhadas.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por guiar meus caminhos, pela força espiritual, pelos momentos de reflexão e crescimento diante dos obstáculos.

Aos meus pais, Hamilton e Rosili, pelo bom exemplo e por me ajudar a superar, a acreditar e que apesar da distância sempre estiveram presentes e sempre me incentivaram nos estudos. Para vocês o meu sempre muito obrigada.

A toda a minha família que sempre me apoio e incentivou em todos os momentos. Minha irmã Daniele pelo apoio científico e meu irmão Thiago pelo apoio computacional e minhas avós, Dylvete e Herminia, pela compreensão da minha ausência, por sempre me apoiarem e pelas inesgotáveis orações.

À orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Silvia Maria Suter Correia Cadena, um exemplo de pesquisadora, professora e ser humano. Uma pessoa iluminada e de muita garra, que me adotou desde o início deste trabalho e até hoje tem a paciência de orientar, apoiar e me incentivar na pesquisa.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Eva Gunilla Skare Carnieri pelos ensinamentos científicos que contribuíram muito para o meu crescimento profissional, pela atenção, sugestões, amizade e por todo o carinho a mim dispensado. Muito obrigada por me mostrar, incentivar e ensinar o maravilhoso mundo das mitocôndrias de plantas.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Birgit Arnholdt-Schmitt, um exemplo de pesquisadora e ser humano. Uma pessoa iluminada de muita garra e força, que tive a oportunidade de conviver no período que passei em Portugal. Seus ensinamentos contribuíram muito para o meu crescimento profissional e pessoal.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Juliana Bello Baron Maurer e Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Eliane Merlin Rocha pelas correções dos relatórios, artigos e textos.

Aos professores doutores Sergio Akira Uyemura, Emy Luiza Ishii Iwamoto, Luiz Fernando Pereira, Juliana Bello Baron Maurer membros da banca examinadora.

Ao Prof. Dr. Miguel Pedro Guerra pela gentileza em ceder as células embriogênicas de araucária que foram utilizadas nesse estudo.

Ao Prof. Dr. Sergio Akira Uyemura por ter gentilmente doado os anticorpos da AOX e da NADH desidrogenase alternativa.

Ao Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza pela atenção e ajuda nos experimentos de *western blot* realizados em seu laboratório, bem como pela ajuda na interpretação dos resultados.

Aos amigos Regina, Rodrigo, Francine, Gisele, Kátia, Vanessa, Carol e Leo Bottega pelos conselhos, convivência, amizade duradoura e paciência, até quando eu não me agüentava. Vocês são exemplos de competência, profissionalismo e grandes amigos. Se não fossem os seus incentivos e acupuntura eu não teria chegado aqui.

Aos amigos e colegas do laboratório Oxidações Biológicas Amanda, Aninha, Andréia, Beth, Carina, Camila, Carol, Glaucio, Juliana, Lyvia, Monique, Paty e Thiago. Obrigada por sempre me ajudarem quando foi preciso e obrigada pelos vários momentos de descontração tornando o trabalho no laboratório ainda mais agradável.

Aos amigos e colegas do laboratório de Biologia Molecular em Portugal Elisete, Hélia, Luz, Amaia, Alexandre, Dorotéia, Rajev, Carlos, Yane, Miguel, Virginia e Dona Felicidade pela convivência, amizade, ensinamentos e constantes trocas de experiência.

Agradeço a todas as professoras do laboratório de Oxidações Biológicas, pela atenção, compreensão, conselhos e pela paciência.

Agradeço também aos professores, funcionários, colegas do laboratório e do departamento, especialmente as alunas de iniciação científica Patrícia e Catherine pela ajuda durante o repique das células, isolamento das mitocôndrias e experimentos realizados. Também agradeço a Vivian por toda ajuda dedicada nos experimentos de *western blot*. E ao Marco Aurélio e Marco Antônio pela ajuda nos experimentos, interpretação de resultados e uso dos equipamentos.

Agradeço a Coordenação da Pós-Graduação em Bioquímica por todo o apoio concedido. Agradeço também o apoio financeiro da Capes e CNPq.

E finalmente, ao João, por me proporcionar tantas felicidades, pela paciência em me acompanhar neste período, me fazendo sentir especial e forte para realização de futuros sonhos.

Agradeço a todos aqueles que de forma direta ou indireta colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho, pois sem eles este trabalho seria inviável.

Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.

*Charles Chaplin*

## RESUMO

*Araucaria angustifolia* (Bert.) Kuntze é uma conífera do sul do Brasil que tem seu desenvolvimento intimamente ligado ao clima. Esta gimnosperma é encontrada em regiões de clima temperado úmido, com temperaturas mínimas abaixo de 0°C em algumas regiões. O conhecimento dos fatores fisiológicos e bioquímicos que influenciam o crescimento e o desenvolvimento da araucária é fundamental para o entendimento do comportamento da espécie frente a diferentes condições ambientais, fornecendo subsídios para a sugestão de práticas de reflorestamento e regeneração natural da espécie. Aumentos nos níveis de espécies reativas de oxigênio têm sido descritos em plantas expostas a baixas temperaturas. A cadeia transportadora de elétrons de mitocôndrias de planta é uma importante fonte de ROS. No entanto, estas organelas possuem sistemas enzimáticos que são capazes de impedir a produção de ROS e, também, de promover a sua remoção, como a PUMP, AOX, NADP(H) desidrogenases e algumas enzimas antioxidantes. No presente estudo, culturas de células embriogênicas de *Araucaria angustifolia* foram submetidas ao estresse pelo frio (4°C durante 24 h ou 48 h) e foram avaliados a viabilidade celular e, em mitocôndrias isoladas, a atividade da PUMP, AOX, catalase, SOD, APX e GR, níveis de ROS e lipoperoxidação. A viabilidade celular, avaliada pelos métodos do azul de Evans, do FDA mais IP e do MTT, não foi afetada pelo frio. Em mitocôndrias isoladas das células estressadas, a atividade da PUMP aumentou em ~50% (24 h e 48 h), como determinado pelos ensaios de consumo de oxigênio, após a adição de ácido linoleico e a inibição por BSA mais ATP. Esta ativação foi confirmada pelos ensaios de potencial elétrico de membrana ( $\Delta\psi$ ). Por outro lado, a atividade da AOX não foi alterada, como demonstrado pelos ensaios de consumo de oxigênio (insensível a cianeto e sensível ao SHAM). Em relação a AOX, foi identificado um segmento conservado de 444 pb no exon 3, que a classifica como AOX1. Quanto as enzimas antioxidantes, o estresse pelo frio (4°C) causou um aumento na atividade da catalase em 24 h (~32%), diminuição da GR (~15%) e nenhum efeito sobre a SOD e APX. Já o estresse por 48 h promoveu a diminuição das atividades da catalase (~57%), da GR (~15%) e nenhum efeito sobre a SOD e APX. Os níveis de ROS, determinados em ensaios com a sonda DCF-DA, foram aumentados no estresse 24 h e 48 h em ~25% e ~15%, respectivamente. A lipoperoxidação, avaliada pela medida de TBARS, aumentou em ~24% após o estresse de 48 h. Os resultados deste estudo sugerem que o estresse pelo frio, apesar de não comprometer a viabilidade das células de *A. angustifolia*, promove o aumento dos níveis de ROS, e que o estímulo da PUMP e da catalase mitocondrial fazem parte da resposta destas células a esta condição.

Palavras-chaves: *A. angustifolia*; estresse pelo frio; mitocôndrias; estresse oxidativo.

## ABSTRACT

*Araucaria angustifolia* (Bert.) Kuntze is an endangered native conifer from southern Brazil that has its development closely related to climate. This gymnosperm is found in humid temperate regions, with minimum temperatures below 0°C in some regions. Physiological and biochemical knowledge regarding the growth and development of *araucaria* is fundamental to understanding the behavior of the species in response to different environmental conditions, thereby supporting reforestation and natural regeneration practices. Increased ROS levels have been reported in plants exposed to cold stress. The electron transport chain of plant mitochondria is an important source of reactive oxygen species (ROS) in the cell. However, these organelles possess enzymatic systems that are able to prevent ROS production or promote their detoxification including NAD(P)H dehydrogenases, AOX and PUMP as well as antioxidant enzymes. In this study, embryogenic cell cultures of *Araucaria angustifolia* were subjected to cold stress (4°C for 24 h or 48 h) and the cell viability was determined. In isolated mitochondria the activities of PUMP, AOX, catalase, SOD, APX and GR were evaluated, and the levels of ROS and lipid peroxidation were measured. Cell viability, evaluated by Evans blue, FDA plus IP and MTT methods, was unaffected by cold stress. In the mitochondria of stressed cells, PUMP activity increased by approximately 50% (at 24 h and 48 h), which was determined by measuring oxygen consumption after the addition of linoleic acid and inhibition by BSA plus ATP. PUMP activation was confirmed using transmembrane electrical potential ( $\Delta\psi$ ) assays. AOX activity was not modified in the mitochondria from stressed cells, as demonstrated by unaltered oxygen consumption in the presence of cyanide-resistant and sensitive to salicylhydroxamic acid (SHAM). Also regarding AOX, a conserved region of 444 pb in exon 3 was identified, which classifies it as AOX1. Cold stress (4°C, 24 h) did not affect SOD and APX activities; however, catalase and GR had their activities increased and decreased by ~32% and ~15%, respectively. After 48 h of cold stress, similar effects were observed for APX and SOD but catalase and GR were inhibited by ~57% and ~15%, respectively. ROS levels, determined in assays using DCF-DA, were increased by ~25% after 24 h and by ~15% after 48 h stress. Lipid peroxidation, evaluated by measuring TBARS, was increased by ~24% after 48 h of stress. These results suggest that although cold stress did not compromise the viability of cells of *A. angustifolia* it is able to promote the increase of ROS. The results also indicate that the stimulation of mitochondrial catalase and PUMP are important responses of these cells to this condition.

Keywords: *A. angustifolia*, cold stress; mitochondria; oxidative stress.



## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.	CÉLULAS EMBRIOGÊNICAS DE <i>Araucaria angustifolia</i> ...	23
FIGURA 2.	REPRESENTAÇÃO DAS FASES DE CRESCIMENTO DAS CULTURAS DE CÉLULAS EMBRIOGÊNICAS DE <i>A. angustifolia</i> CRESCIDAS EM SUSPENSÃO.....	24
FIGURA 3.	NAD(P)H DESIDROGENASES ALTERNATIVAS DE MITOCÔNDRIAS DE PLANTAS .....	26
FIGURA 4.	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA AOX NA CADEIA RESPIRATÓRIA DE MITOCÔNDRIA DE PLANTAS.....	29
FIGURA 5.	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA PUMP NA MEMBRANA MITOCONDRIAL INTERNA.....	32
FIGURA 6.	MODELOS PROPOSTOS PARA O TRANSPORTE DE PRÓTONS PELA PUMP PARA A MATRIZ MITOCONDRIAL.....	33
FIGURA 7.	CICLO ASCORBATO-GLUTATIONA.....	40
FIGURA 8.	PRINCIPAIS MECANISMOS ENZIMÁTICOS DE DEFESA CONTRA ROS EM PLANTAS.....	41
FIGURA 9.	METODOLOGIA DE ISOLAMENTO DE MITOCÔNDRIAS DE CÉLULAS EMBRIOGÊNICAS DE <i>A. angustifolia</i> .....	52
FIGURA 10.	DIFERENTES <i>PRIMERS</i> DESENHADOS PARA O GENE <i>aox</i> .....	59
FIGURA 11.	MAPA DO VETOR pGEM <sup>®</sup> -T EASY.....	60
FIGURA 12.	MORFOLOGIA DAS CÉLULAS EMBRIOGÊNICAS DE <i>A. angustifolia</i> .....	63
FIGURA 13.	EFEITO DO ESTRESSE PELO FRIO SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS EMBRIOGÊNICAS DE <i>A. angustifolia</i> .....	65
FIGURA 14.	EFEITO DO ESTRESSE PELO FRIO SOBRE A ATIVIDADE DA PUMP – ENSAIOS DE CONSUMO DE OXIGÊNIO.....	68

FIGURA 15.	EFEITO DO ESTRESSE PELO FRIO SOBRE A ATIVIDADE DA PUMP – ENSAIOS DE POTENCIAL DE MEMBRANA ( $\Delta\psi$ ).....	71
FIGURA 16.	EFEITO DO ESTRESSE PELO FRIO SOBRE A ATIVIDADE DA AOX – ENSAIOS DE CONSUMO DE OXIGÊNIO.....	74
FIGURA 17.	EFEITO DO ESTRESSE PELO FRIO SOBRE A ATIVIDADE DA CATALASE.....	78
FIGURA 18.	EFEITO DO ESTRESSE PELO FRIO SOBRE A ATIVIDADE DA MnSOD.....	80
FIGURA 19.	EFEITO DO ESTRESSE PELO FRIO SOBRE A ATIVIDADE DA ASCORBATO PEROXIDASE.....	82
FIGURA 20.	EFEITO DO ESTRESSE PELO FRIO SOBRE A ATIVIDADE DA GLUTATIONA REDUTASE.....	84
FIGURA 21.	EFEITO DO ESTRESSE PELO FRIO SOBRE OS NÍVEIS DE ROS.....	88
FIGURA 22.	EFEITO DO ESTRESSE PELO FRIO SOBRE A LIPOPEROXIDAÇÃO FERRO-INDUZIDA.....	91
FIGURA 23.	PERFIL ELETROFORÉTICO EM GEL DE AGAROSE DO DNA DE <i>A. angustifolia</i> .....	92
FIGURA 24.	PERFIL ELETROFORÉTICO EM GEL DE AGAROSE MOSTRANDO OS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS ATRAVÉS DE PCR.....	94
FIGURA 25.	RESULTADOS DAS REAÇÕES DE DIGESTÃO DOS CLONES RECOMBINANTES UTILIZANDO AS ENZIMAS DE RESTRIÇÃO <i>EcoRI</i> , <i>HpyF3I</i> e <i>AluI</i> .....	96
FIGURA 26.	ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS DA AOX DOS CLONES AaAOXcl5 E AaAOXcl15.....	97
FIGURA 27.	ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DA AOX DOS CLONES AaAOXcl5 E AaAOXcl15.....	99
FIGURA 28.	ÁRVORE FILOGENÉTICA DA AOX.....	101

**LISTA DE TABELAS**

TABELA 1.	SEQUÊNCIA DOS <i>PRIMERS</i> DA AOX UTILIZADOS NA AMPLIFICAÇÃO POR PCR.....	58
TABELA 2.	ENZIMAS DE RESTRIÇÃO UTILIZADAS NA ANÁLISE DO DNA DO PLASMÍDIO.....	95
TABELA 3.	NÍVEIS DE IDENTIDADE DAS SEQUÊNCIAS DA AOX DE <i>A. angustifolia</i> .....	98
TABELA 4.	NÍVEIS DE IDENTIDADE DAS SEQUÊNCIAS DA AOX DE <i>A. angustifolia</i> .....	100

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABA	ácido abscísico
AG	ácido graxo
AGP	arabinogalactana-proteína
AL	ácido linoleico
AOX	oxidase alternativa
<i>aox1(a-d)</i>	gene codificador da proteína AOX1 (a-d)
AOX1(a-d)	proteína AOX1(a-d)
<i>aox2</i>	gene codificador da proteína AOX2
AOX2	proteína AOX2
<i>aox3</i>	gene codificador da proteína AOX3
AOX3	proteína AOX3
APX	ascorbato peroxidase
<i>AtPUMP1-6</i>	gene codificador da proteína PUMP1-6 em <i>Arabidopsis</i>
<i>AtUCP1-3</i>	gene codificador da proteína PUMP1-3 em <i>Arabidopsis</i>
BAP	6-benzilaminopurina
BHAM	ácido benzilhidroxâmico
BHT	butil hidroxitolueno
BSA	albumina de soro bovino
CAT	catalase
<i>cat1</i>	gene codificador da proteína CAT1
<i>cat2</i>	gene codificador da proteína CAT2
<i>cat3</i>	gene codificador da proteína CAT3
CCR	coeficiente de controle respiratório
<i>csd1</i>	gene codificador da proteína Cu/ZnSOD1
<i>csd2</i>	gene codificador da proteína Cu/ZnSOD2
<i>csd3</i>	gene codificador da proteína Cu/ZnSOD3
DAB	3,3'-diaminobenzidina
DCFH-DA	diacetato de diclorofluoresceína
DCFH	diclorofluoresceína reduzida
DCF	diclorofluoresceína

DH	desidrogenase
DHA	deidroascorbato
DHAR	deidroascorbato redutase
DMSO	dimetilsulfóxido
DTT	ditiotreitól
2,4-D	ácido 2,4-diclorofenóxiacético
EDTA	ácido etileno diamino tetracético
EGTA	ácido etileno glico-bis( $\beta$ -amino éter) N, N, N', N'-tetracético
FCCP	carbonil cianida <i>p</i> -trifluorometoxifenilhidrazona
FDA	diacetato de fluoresceína
<i>fsd1</i>	gene codificador da proteína FeSOD1
<i>fsd2</i>	gene codificador da proteína FeSOD2
<i>fsd3</i>	gene codificador da proteína FeSOD3
GA	ácido giberélico
GPX	glutathione peroxidase
GR	glutathione redutase
GSH	glutathione reduzida
GSSG	glutathione oxidada
HEPES	[N-(2 hidroxietil) piperazina N'-(2 ácido etanosulfônico)]
IP	iodeto de propídio
Mal/glut	malato/glutamato
MDA	monodeidroascorbato
MDAR	monodeidroascorbato redutase
MES	ácido 2-morfolinoetanosulfônico monohidratado
<i>msd1</i>	gene codificador da proteína MnSOD1
MTT	brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]
<i>nda1-2</i>	gene codificador da proteína NDA1-2
NDA1-2	proteína NADH desidrogenase A1-2
<i>ndb1-4</i>	gene codificador da proteína NDB1-4
NDB1-4	proteína NADH desidrogenase B1-4
<i>ndc1</i>	gene codificador da proteína NDC1
NDC1	proteína NADH desidrogenase C1
PA	poliaminas

PCR	reação em cadeia da polimerase
PBS	solução salina tamponada
Pi	fosfato inorgânico
PVDF	fluoreto de polivinilideno
PUMP	proteína desacopladora de mitocôndrias de plantas
SDS	dodecil sulfato de sódio
SOD	superóxido dismutase
ROS	espécies reativas de oxigênio
SHAM	ácido salicilhidroxâmico
SsPUMP1-5	gene codificador da proteína PUMP1-5 em cana-de-açúcar
StUCP	gene codificador da proteína PUMP em tubérculo de batata
TBA	ácido tiobarbitúrico
TBARS	substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	ácido tricloroacético
UA	unidades arbitrárias (fluorescência)
UCP	proteína desacopladora mitocondrial
UQ	ubiquinona
UQH <sub>2</sub>	ubiquinol
Tris	tris (hidrometil) amino metano
TPM	transição de permeabilidade mitocondrial
$\Delta\psi$	potencial elétrico de membrana

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
<b>2.</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>20</b>
2.1	<i>Araucaria angustifolia</i> .....	20
2.1.1	Culturas Embrionárias de <i>A. angustifolia</i> .....	22
2.2	MITOCÔNDRIAS DE PLANTAS.....	25
2.2.1	NAD(P)H Desidrogenases Alternativas.....	25
2.2.2	Oxidase Alternativa (AOX).....	28
2.2.3	Proteína Desacopladora de Plantas (UCP ou PUMP).....	32
2.3	ESTRESSE.....	37
2.4	PRODUÇÃO DE ROS E DEFESAS ANTIOXIDANTES.....	38
<b>3.</b>	<b>JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS.....</b>	<b>44</b>
<b>4.</b>	<b>ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL.....</b>	<b>46</b>
<b>5.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>47</b>
5.1	REAGENTES.....	47
5.2	CULTIVO E MANUTENÇÃO DAS CÉLULAS EMBRIOGÊNICAS DE <i>A. angustifolia</i> .....	47
5.3	CONDIÇÕES DE ESTRESSE.....	48
5.4	ANÁLISES MORFOLÓGICAS.....	48
5.5	DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR .....	49
5.6	ISOLAMENTO DE MITOCÔNDRIAS.....	50
5.7	PURIFICAÇÃO DAS MITOCÔNDRIAS .....	51
5.8	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	51
5.9	DETERMINAÇÃO DO CONSUMO DE OXIGÊNIO – ATIVIDADES DA PUMP E AOX .....	53

5.10	DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ELÉTRICO DE MEMBRANA ( $\Delta\Psi$ ) – ATIVIDADE DA PUMP.....	54
5.11	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES.....	54
5.11.1	Catalase (CAT).....	54
5.11.2	Superóxido dismutase (MnSOD).....	55
5.11.3	Ascorbato peroxidase (APX).....	55
5.11.4	Glutathione Redutase (GR).....	56
5.12	DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE ROS.....	56
5.13	DETERMINAÇÃO DA LIPOPEROXIDAÇÃO MITOCONDRIAL....	57
5.14	SEQUENCIAMENTO DO GENE DA <i>aox</i> .....	57
5.14.1	Extração de DNA das células embriogênicas de <i>A. angustifolia</i> ...	57
5.14.2	Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	58
5.14.3	Reações de clonagem.....	58
5.14.4	Análise da sequência.....	59
5.15	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	60
6.	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	61
6.1	MORFOLOGIA DAS CÉLULAS EMBRIOGÊNICAS DE <i>A. angustifolia</i> .....	61
6.2	EFEITO DO ESTRESSE PELO FRIO SOBRE A VIABILIDADE DAS CÉLULAS EMBRIOGÊNICAS DE <i>A. angustifolia</i> .....	62
6.3	EFEITO DO ESTRESSE PELO FRIO NA ATIVIDADE DA PUMP E DA AOX.....	66
6.4	EFEITO DO ESTRESSE PELO FRIO NA ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES.....	75
6.4.1	Catalase (CAT).....	76
6.4.2	Superóxido dismutase (MnSOD).....	79
6.4.3	Ascorbato peroxidase (APX).....	81



6.4.4	Glutationa Redutase (GR).....	83
6.5	EFEITO DO ESTRESSE PELO FRIO SOBRE OS NÍVEIS ROS.....	85
6.6	EFEITO DO ESTRESSE PELO FRIO SOBRE A LIPOPEROXIDAÇÃO.....	89
6.7	SEQUENCIAMENTO DO GENE DA <i>aox</i> DE CÉLULAS EMBRIOGÊNICAS DE <i>A. angustifolia</i> .....	92
6.7.1	Extração e quantificação do DNA genômico.....	92
6.7.2	Isolamento dos genes da <i>aox</i> por PCR.....	93
6.7.3	Clonagem dos genes da <i>aox</i> e análise com enzimas de restrição.....	94
6.7.4	Caracterização do gene da <i>aox</i> .....	95
7.	<b>CONCLUSÕES</b> .....	102
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	103

## 1. INTRODUÇÃO

Nas plantas, a cadeia transportadora de elétrons é uma importante fonte de espécies reativas de oxigênio (ROS) (MØLLER, 2001; APEL & HIRT, 2004; RHOADS *et al.*, 2006). Entretanto, estas organelas possuem sistemas enzimáticos capazes de prevenir a formação ou promover a remoção de ROS, incluindo NADP(H) desidrogenases alternativas, oxidase alternativa (AOX) e a proteína desacopladora de mitocôndrias de plantas (PUMP), bem como as enzimas antioxidantes, por exemplo, a catalase, superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e glutathione redutase (GR) (VERCESI *et al.*, 1995; MITTLER, 2002; RASMUSSEN *et al.*, 2004; VERCESI *et al.*, 2006; NAVROT *et al.*, 2007; RASMUSSEN *et al.*, 2009). A PUMP e AOX, são denominadas frequentemente de sistemas dissipadores de energia por diminuírem a eficiência da fosforilação oxidativa. A PUMP, por aumentar a condutância de prótons através da membrana mitocondrial interna, promove a dissipação gradiente eletroquímico de prótons. Por sua vez, a AOX oferece um caminho alternativo para a redução do oxigênio, sem a participação dos complexos III e IV (VERCESI *et al.*, 1995; MITTLER, 2002; VERCESI *et al.*, 2006; NAVROT *et al.*, 2007; BORECKÝ *et al.*, 2006). Portanto, a ação conjunta destas enzimas resulta no aumento do fluxo de elétrons através da cadeia respiratória o que previne a formação de ROS (KOWALTOWSKI *et al.*, 1998; MAXWELL *et al.*, 1999; BORECKÝ & VERCESI, 2005; VERCESI *et al.*, 2006; RASMUSSEN *et al.*, 2009; VAN AKEN *et al.*, 2009).

Aumentos dos níveis de ROS têm sido descritos em plantas expostas a extremos de temperatura. Mitocôndrias isoladas de plantas submetidas a baixas temperaturas apresentaram um aumento na atividade ou expressão das NAD(P)H desidrogenases, AOX e PUMP, como também de algumas enzimas antioxidantes (NANTES *et al.*, 1999; CALEGARIO *et al.*, 2003; KUK *et al.*, 2003; FIORANI *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2011). Este efeito foi associado com a proteção contra ROS em mono e dicotiledôneas, entretanto, são escassos na literatura os relatos sobre gimnospermas (MARIANO *et al.*, 2008; FREDERICO *et al.*, 2009a). A proposta do presente estudo foi avaliar as funções mitocondriais de células embriogênicas de *Araucaria angustifolia* em condições de estresse por baixas temperaturas, particularmente em relação à atividade da

AOX, PUMP e de enzimas antioxidantes e, a produção de ROS e a lipoperoxidação. Ainda, também como dado inédito deste estudo, foi determinada uma parte da sequência do gene da AOX referente a porção conservada do exon 3.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA

### 2.1 *Araucaria angustifolia*

*Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze, conhecida como pinheiro do Paraná encontra-se amplamente distribuída no sul do Brasil, principalmente nos planaltos frios dos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Em altitudes elevadas e de forma esparsa, esta gimnosperma também é encontrada em São Paulo, Minas Gerais e no Rio de Janeiro (SHIMIZU & OLIVEIRA, 1981; CARVALHO, 1994). A araucária teve sua exploração intensificada a partir de 1935 e as reservas de São Paulo foram exauridas nas décadas de 30 e 40 e no estado do Paraná nos anos 70 (SHIMIZU & OLIVEIRA, 1981; MATTOS, 1994). Devido à intensa exploração, esta gimnosperma encontra-se na lista das espécies ameaçadas de extinção, incluída na categoria vulnerável (espécie enfrenta alto risco de extinção na natureza - IBAMA, 2008 - Instrução Normativa nº 6, de 23 de setembro de 2008).

As matas remanescentes correspondem a menos de 3% da área original em todo o Brasil e as florestas restantes encontram-se muito fragmentadas e dispersas, o que contribui para diminuir ainda mais a variabilidade genética da espécie (SHIMIZU & OLIVEIRA, 1981; CARVALHO, 1994; LOBO, 2003).

Esta conífera pertence à família Araucariaceae, sendo a única espécie do gênero de ocorrência natural no Brasil. Do ponto de vista biogeográfico, é uma das famílias mais interessantes entre as gimnospermas, pois representa árvores das mais antigas (CARVALHO, 1994; SETOGUCHI *et al.*, 1998). As árvores são monóicas, com 50 a 120 centímetros de diâmetro e com 10 a 35 metros de altura, os troncos são retos, raramente ramificados em dois, e quase cilíndricos e a casca é grossa e resinosa (CARVALHO, 1994).

De grande importância econômica para o Brasil na década de 70, estas árvores forneceram madeira, fibra, resina e sementes que apresentam alto valor nutritivo, sendo consumidas por humanos e animais (GUERRA *et al.*, 2000). A madeira da araucária é constituída de fibras longas (celulose 58,3% e lignina 28,3%), sendo adequada para a produção de celulose e de papel. Esta característica somada a exigência de menor branqueamento químico na fase

de processamento industrial, fazem com que a espécie seja considerada ambientalmente mais adequada para a produção de papel em relação as demais, como por exemplo, o *Pinus* (CARVALHO, 1994; GUERRA *et al.*, 2000; GUERRA *et al.*, 2002). A madeira laminada foi um item importante de exportação por um longo período, ocupando, em 1964, o 4º lugar entre os produtos brasileiros exportados (REITZ *et al.*, 1978).

Com o desenvolvimento intimamente ligado a altitude e ao clima, a ocorrência desta planta se dá entre altitudes variando de 600 a 800 metros, podendo ser encontradas em altitude superiores a 1500 metros (SHIMIZU & OLIVEIRA, 1981; BEHLING, 1997; SCHEEREM *et al.*, 2000). Ocorrem em clima temperado úmido com temperaturas médias anuais entre 13°C e 18°C e com mínimas inferiores a 0°C em algumas regiões (SHIMIZU & OLIVEIRA, 1981; BEHLING, 1997; SCHEEREM *et al.*, 2000). Seu reflorestamento é limitado por condições específicas requeridas para o cultivo, como o clima e as características de solo, que deve ter profundidade e capacidade de retenção de água adequadas. Variáveis destas condições interferem no crescimento e no desenvolvimento da planta (CASSOL, 1982; ANDRAE & KRAPPENBAUER, 1983; SCHEEREM *et al.*, 2000).

A araucária necessita, ainda, de uma grande demanda de nutrientes para o seu desenvolvimento, como de nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio e boro (BLUM, 1977; CASSOL, 1982; SCHEEREM *et al.*, 2000). Estes fatores associados com o longo período reprodutivo entre a polinização e a formação das sementes, também dificulta seu reflorestamento em grande escala (GUERRA *et al.*, 2000). O pinheiro do Paraná produz anualmente cerca de 40 pinhas, chegando a atingir até 200 pinhas por planta (CARVALHO, 1994). Quando plantadas, as árvores isoladas iniciam a produção de pinhões entre 10 e 15 anos, porém, em povoamentos, a produção ocorre a partir de 20 anos (CARVALHO, 1994; GUERRA *et al.*, 2002).

Na região Sul do Brasil, em resposta ao intenso desmatamento das últimas décadas, o seu cultivo tem recebido grande incentivo por parte de órgãos governamentais federais, estaduais e municipais, ligados ao meio ambiente e à agricultura como a Embrapa Florestas em Colombo no Paraná que vem pesquisando sobre a araucária há mais de 20 anos. O desenvolvimento de novas técnicas para a conservação, para o melhoramento

genético, bem como o reflorestamento têm sido requeridos para a sobrevivência desta espécie (GUERRA *et al.*, 2000). É muito importante para manutenção da espécie que os fatores bióticos e abióticos envolvidos na expansão da floresta da araucária continuem sendo investigados (DUARTE *et al.*, 2006; FONTOURA *et al.*, 2006).

#### 2.1.1 Culturas de Células Embriogênicas de *A. angustifolia*

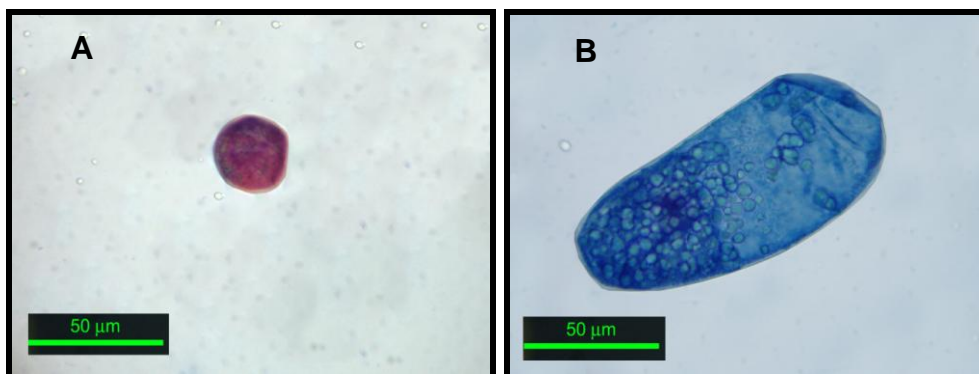
Culturas de células embriogênicas de *A. angustifolia* são obtidas através de embriões zigóticos, que são retirados de cones femininos (pinhões) imaturos e inoculados no meio básico de crescimento celular (VON ARNOLD & ERIKSSON, 1981).

A frequência de indução das culturas embriogênicas é afetada por diversos fatores como: o genótipo da planta mãe; a presença de fitorreguladores, como o ácido 2,4-diclorofenóxiacético (2,4-D), cinetina e benzilaminopurina (BAP); as fontes de carboidratos, como sacarose, maltose e lactose; a composição e níveis de nitrogênio; a escolha do estágio de desenvolvimento do explante e a data da coleta do pinhão, que deve ser realizada nos meses de dezembro a fevereiro (TAUTORUS *et al.*, 1991; RADOJEVIC *et al.*, 1999; SANTOS *et al.*, 2002; STEINER *et al.*, 2005).

O conhecimento das etapas relacionadas ao desenvolvimento destas culturas como a indução, a proliferação e o efeito do ácido abscísico (ABA) e dos agentes osmóticos, são de fundamental importância para o entendimento da embriogênese somática (ASTARITA & GUERRA, 1998; GUERRA *et al.*, 2000; ASTARITA & GUERRA, 2000). O ABA regula os diferentes aspectos do desenvolvimento e a germinação da semente e, sua adição ao meio de cultura aumenta a frequência de embriões somáticos e sua conversão para planta (VON ARNOLD *et al.*, 2002; KUCERA *et al.*, 2005; PIERUZZI *et al.*, 2011). Carboidratos, como a sacarose e maltose, associados ao ABA, têm sido utilizados para promover a maturação somática dos embriões em coníferas (VON ARNOLD *et al.*, 2002).

No entanto, o processo de maturação das culturas embriogênicas de araucária encontra-se parcialmente desenvolvido e até o momento não foram obtidos embriões somáticos maduros (GUERRA *et al.*, 2000; SANTOS *et al.*, 2002; SILVEIRA *et al.*, 2002; SANTOS *et al.*, 2008). O uso da técnica de embriogênese somática não permite a clonagem comercial da araucária, e os programas de reflorestamento não tem alcançado bons resultados, devido ao baixo número de embriões (ASTARITA & GUERRA, 1998; SANTOS *et al.*, 2008; MAURER *et al.*, 2010a).

As culturas embriogênicas de *A. angustifolia* são constituídas de dois tipos celulares, as células embrionárias e as células suspensoras (Figura 1). As células embrionárias são isodiamétricas, pequenas, de citoplasma denso e reativas ao carmim acético, sendo coradas em vermelho. Já as células suspensoras, são alongadas, com vacúolos e permeáveis ao azul de Evans, sendo, portanto, coradas em azul (ASTARITA & GUERRA, 2000; STEINER *et al.*, 2005; SILVEIRA *et al.*, 2006). As células embrionárias e suspensoras apresentam-se agrupadas em agregados, durante a proliferação (STEINER *et al.*, 2005; SILVEIRA *et al.*, 2006), sendo as embrionárias associadas com a competência para o desenvolvimento celular (STEINER *et al.*, 2005).



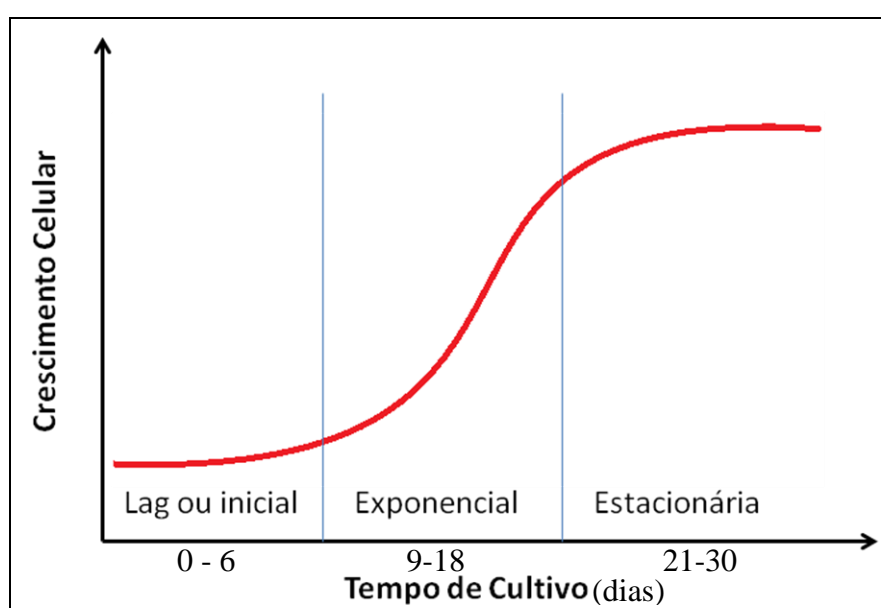
**FIGURA 1. CÉLULAS EMBRIOGÊNICAS DE *Araucaria angustifolia***

FONTE: Valente, (2007).

NOTA: a) célula embrionária - reativa ao carmim acético e b) célula suspensora - permeável ao corante azul de Evans.

A dinâmica de crescimento das culturas de células embriogênicas de *A. angustifolia* crescidas em suspensão é descrita como uma curva sigmóide,

apresentando uma fase de desenvolvimento inicial (fase lag), seguida pelas fases exponencial e estacionária (Figura 2). A fase lag é considerada como um período de adaptação, durante o qual as células assimilam os nutrientes disponíveis no meio de cultura. Já a fase exponencial é caracterizada por um período de intensa divisão celular. Na fase estacionária, a taxa de crescimento celular diminui gradativamente até alcançar a fase linear, onde começa a ocorrer a redução da divisão celular (ASTARITA & GUERRA, 1998; SILVEIRA *et al.*, 2002; STEINER, 2005; SANTOS *et al.*, 2008 e 2010; MAURER *et al.*, 2010b).



**FIGURA 2. REPRESENTAÇÃO DAS FASES DE CRESCIMENTO DA CULTURA DE CÉLULAS EMBRIOGÊNICAS DE *A. angustifolia* CRESCIDAS EM SUSPENSÃO**

FONTE: Adaptado de Astarita & Guerra (1998); Steiner, (2005).

NOTA: Curva padrão de crescimento celular, onde se relaciona o número de células ou crescimento celular com o tempo de cultivo. As diferentes fases de crescimento são: lag ou inicial, exponencial e estacionária.

Estas culturas também têm sido utilizadas com sucesso em estudos de crescimento celular, de liberação de componentes extracelulares como a proteoglicana arabinogalactana-proteína (AGP), de hormônios como as poliaminas (PA) (putrescina, espermina e espermidina) e de processos bioquímicos e fisiológicos (ASTARITA & GUERRA, 1998 e 2000; SILVEIRA *et*



*al.*, 2002; MARIANO *et al.*, 2004 e 2008; STEINER *et al.*, 2007; SANTOS *et al.*, 2008 e 2010; MAURER *et al.*, 2010a,b).

Nos últimos anos, estas células têm sido analisadas quanto a sua constituição gênica e proteica (SANTOS *et al.*, 2006; SILVEIRA *et al.*, 2008; BALBUENA *et al.*, 2009 e 2011; STEINER, 2009; HAMPP *et al.*, 2000; SCHLÖGL *et al.*, 2012a,b). Estudos de proteômica têm procurado caracterizar o perfil de expressão de proteínas durante as diferentes fases do desenvolvimento do embrião zigótico (SANTOS *et al.*, 2006; SILVEIRA *et al.*, 2008; BALBUENA *et al.*, 2009 e 2011) e somático (STEINER, 2009). Como para algumas espécies de coníferas as proteínas de reserva são similares, estas podem ser usadas como marcadores do desenvolvimento vegetal (HAKMAN, 1993; SILVEIRA *et al.*, 2008; BALBUENA *et al.*, 2009 e 2011; STEINER, 2009). Por sua vez, a análise de genes expressos durante as diferentes fases do desenvolvimento embrionário também podem ser útil para identificar aqueles que desempenham importantes funções no controle do desenvolvimento vegetal (SCHLÖGL *et al.*, 2012a).

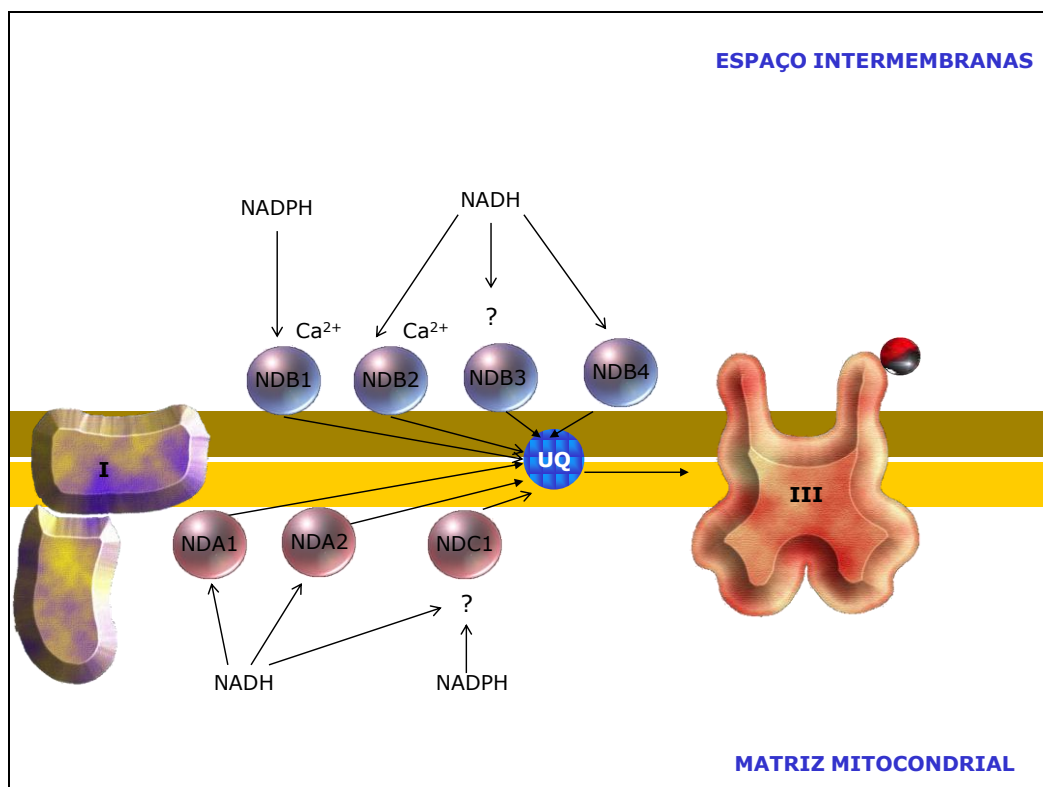
## 2.2 MITOCÔNDRIAS DE PLANTAS

Mitocôndrias de plantas diferenciam-se de mitocôndrias de mamíferos pela presença, na cadeia respiratória, de alguns componentes adicionais como por exemplo: NAD(P)H desidrogenases alternativas (NAD(P)H desidrogenase tipo II), oxidase alternativa (AOX) e a proteína desacopladora (PUMP). A seguir será feita uma breve revisão sobre estes componentes.

### 2.2.1 NAD(P)H Desidrogenases Alternativas

Em mitocôndrias de plantas estão presentes NAD(P)H desidrogenases adicionais insensíveis à rotenona (inibidor do complexo I) e incapazes de bombear prótons. Estas desidrogenases fornecem elétrons diretamente para a ubiquinona, sem a participação do Complexo I e estão localizadas no lado externo [NAD(P)H-DH<sub>ext</sub>], e interno [NAD(P)H-DH<sub>int</sub>] da membrana mitocondrial

interna (Figura 3). Somente as NAD(P)H-DH externas são  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes (GEISLER *et al.*, 2007). Esta família de proteínas tem sido identificada em diferentes tipos de plantas, como também em fungos e bactérias (YAGI, 1991; MELLO *et al.*, 1996; KERSCHER, 2000; MØLLER, 2001; TUDELLA *et al.*, 2003; JUÁREZ *et al.*, 2004; RASMUSSEN *et al.*, 2004).



### FIGURA 3. NAD(P)H DESIDROGENASES ALTERNATIVAS DE MITOCÔNDRIAS DE PLANTAS

FONTE: Adaptado de Rasmusson *et al.*, (2008).

NOTA: Vias de oxidação do NAD(P)H através da cadeia transportadora de elétrons em mitocôndrias de plantas. As setas indicam a transferência de equivalentes redutores, ou seja, dos elétrons. Os pontos de interrogação referem-se a falta de definição das funções enzimáticas de NDB3 e NDC1.

Rasmusson e colaboradores (1999) identificaram em tubérculo de batata (*Solanum tuberosum*) genes correspondentes as NADH desidrogenases do tipo II, denominadas pelos autores de NDA1 e NDB2, com massas molares de 55 e 65 kD, respectivamente. Em *Arabidopsis thaliana* foram identificadas três famílias de genes NAD(P)H desidrogenase tipo II, similares aos descritos por

Rasmusson e colaboradores (1999): *nda1-2*, *ndb1-4* e *ndc1* (MICHALECKA *et al.*, 2003; ELHAFEZ *et al.*, 2006).

Elhafez e colaboradores (2006), e Rasmusson e colaboradores (2008), em abrangente revisão, reuniram informações e descrevem a existência de pelo menos quatro enzimas localizadas na superfície externa da membrana mitocondrial interna, denominadas: NDB1, NDB2, NDB3 e NDB4 e, de três outras NDA1, NDA2 e NDC1 na superfície interna (Figura 3). Propriedades destas enzimas têm sido descritas para angiospermas (monocotiledôneas e dicotiledôneas), incluindo milho (*Zea mays*) (LUETHY *et al.*, 1992), tubérculos de batata (*S. tuberosum*) (MELO *et al.*, 1996; RASMUSSEN *et al.*, 1999), “*woodland tobacco*” (*Nicotiana sylvestris*), *A. thaliana* (MICHALECKA *et al.*, 2003 e 2004, MOORE *et al.*, 2003; ELHAFEZ *et al.*, 2006) e para gimnosperma, *Araucaria angustifolia* (MARIANO *et al.*, 2004).

A função das NDA1 e NDA2 foi determinada em tubérculo de batata (*S. tuberosum*) e *Arabidopsis*. Trata-se de desidrogenases internas responsáveis pela oxidação de NADH da matriz mitocondrial (RASMUSSEN *et al.*, 1999; MOORE *et al.*, 2003). Não foram identificados nestas proteínas quaisquer segmentos relacionados a ligação de cálcio (MICHALECKA *et al.*, 2003; GEISLER *et al.*, 2007). Por outro lado, a proteína NDB1 de tubérculo de batata (*S. tuberosum*) é encontrada no espaço intermembranas e promove a oxidação de NADPH citoplasmático, enquanto as NDB2, 3 e 4 provavelmente oxidam NADH citoplasmático (MICHALECKA *et al.*, 2004; GEISLER *et al.*, 2007). Para as NDB1 e NDB2 foram caracterizados sítios de ligação para o cálcio (GEISLER *et al.*, 2007). NDC1 em tubérculo de batata (*S. tuberosum*) também é uma desidrogenase interna, mas a sua especificidade pelo substrato NADPH não está totalmente esclarecida (MICHALECKA *et al.*, 2004; ELHAFEZ *et al.*, 2006).

Alguns estudos evidenciaram a inibição das NADH desidrogenases alternativas de plantas, de protozoários e de fungos por flavona (TUDELLA *et al.*, 2003; UYEMURA *et al.*, 2004; JUÁREZ *et al.*, 2004; VALENTE, 2007). A presença de NADH desidrogenases alternativas em mitocôndrias de *A. angustifolia* foi confirmada por Mariano *et al.*, (2004). Neste contexto, a adição de 500  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de flavona a mitocôndrias respirando na presença de FCCP e rotenona, causou uma inibição de aproximadamente 60% tanto nas

desidrogenases alternativas externas quanto nas internas (VALENTE, 2007). Em mitocôndrias de *Aspergillus fumigatus* e *Plasmodium yoelii yoelii* na presença de rotenona, a flavona  $500 \mu\text{mol.L}^{-1}$  também inibiu as NADH desidrogenases alternativas (TUDELLA *et al.*, 2003; UYEMURA *et al.*, 2004).

### 2.2.2 Oxidase Alternativa (AOX)

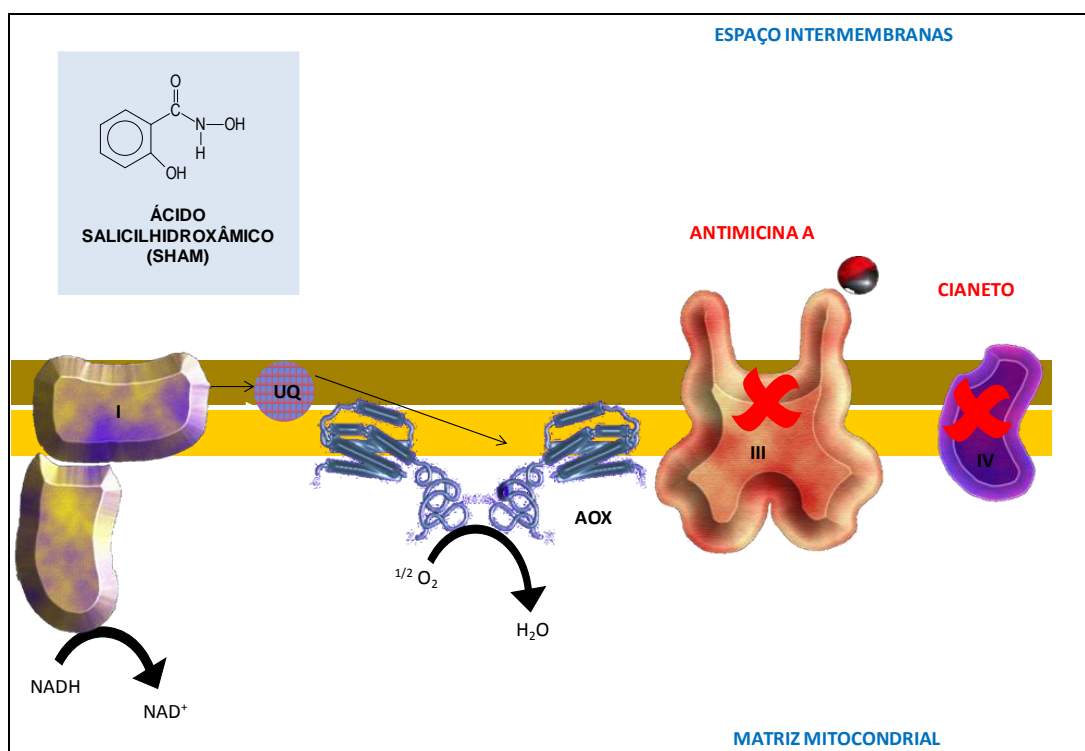
A complexidade da cadeia respiratória de mitocôndrias de plantas deve-se, em parte, a presença de uma via alternativa para a redução do oxigênio em comparação à cadeia respiratória de mamíferos. Nesta via, os elétrons que chegam até a ubiquinona, provenientes das NAD(P)H desidrogenases alternativas ou dos complexos I ou II, ao invés de serem transportados para o complexo III, reduzem diretamente o oxigênio, em processo mediado pela oxidase alternativa (AOX) (Figura 4).

A redução do oxigênio catalisada pela AOX é independente dos complexos III e IV é, portanto, insensível aos inibidores destes, como o cianeto, a antimicina A ou o mixotiazol. Por outro lado, a AOX é inibida por agentes complexantes de ferro, os ácidos hidroxâmicos como o ácido salicilhidroxâmico (SHAM) e o ácido benzohidroxâmico (BHAM), o tiocianato de potássio e o *n*-propilgalato e, estimulada por alfa-cetóácidos, particularmente por piruvato (MILLAR *et al.*, 1996; VANLERBERGHE & McINTOSH, 1997; SIEDOW & UMBACH, 2000). Níveis de ubiquinol ( $\text{UQH}_2$ ) são determinantes para a atividade da enzima, sendo que a ativação da AOX ocorre quando tais níveis ultrapassam um certo limiar (SIEDOW & UMBACH, 2000).

Esta proteína, localizada na membrana mitocondrial interna, foi inicialmente purificada da planta “lírio voodoo” (*Sauromatum guttatum*) (ELTHON & McINTOSH, 1986 e 1987). Entretanto, sua presença tem sido descrita também em outros organismos como protistas e fungos (MINAGAWA & YOSHIMOTO, 1987; CLARKSON *et al.*, 1989; LAMBOWITZ *et al.*, 1989).

Umbach e Siedow (1993) demonstraram que a AOX é um homodímero, cujos monômeros quando unidos covalentemente por ligação dissulfeto (cisteína na posição 78 em *Arabidopsis thaliana* também chamada de cisteína

I), resultam na forma menos ativa da enzima (forma oxidada). Por outro lado, a redução destas ligações, pela adição de ditioneitol (DTT) por exemplo, resulta na forma mais ativa da enzima (forma reduzida). O mesmo resíduo de cisteína (78) responsável pela formação das pontes dissulfeto está também envolvido na ativação da AOX pelo piruvato e outros alfa-cetoácidos (UMBACH *et al.*, 1994; VANLERBERGHE *et al.*, 1995; RHOADS *et al.*, 1998; UMBACH *et al.*, 2002). O piruvato reage com os grupamentos sulfidríla formando um tiohemiacetal o que promove ativação da enzima (RHOADS *et al.*, 1998; SIEDOW & UMBACH, 2000).



**FIGURA 4. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA AOX DA CADEIA RESPIRATÓRIA DE MITOCÔNDRIA DE PLANTAS**

FONTE: Adaptado de Siedow & Umbach, (2000) e Mariano, (2005).

NOTA: A redução do oxigênio catalisada pela AOX é independente dos complexos III e IV é, portanto, insensível aos inibidores destes (cianeto, antimicina A ou o mixotiazol). Por outro lado, é inibida por agentes complexantes de ferro, os ácidos hidroxâmicos como o ácido salicilhidroxâmico (SHAM) e o ácido benzohidroxâmico (BHAM), o tiocianato de potássio e o *n*-propilgalato e, estimulada por alfa-cetoácidos, particularmente por piruvato.

A AOX promove a redução do oxigênio molecular à água, sem o bombeamento de prótons e, conseqüentemente, sem a geração do gradiente

eletroquímico de prótons, não contribuindo, portanto, para o aumento nos níveis do ATP celular (SIEDOW & MOORE, 1993; McINTOSH, 1994; VANLERBERGHE & McINTOSH, 1997). Inicialmente, a presença da AOX foi relacionada apenas com a produção de calor em alguns tecidos termogênicos específicos. De fato, a maior expressão da AOX neste tipo de tecido em plantas, como no “lírio voodoo” (*S. guttatum*), levou inicialmente a conclusão de que esta via estivesse relacionada somente com a produção de calor (MEEUSE, 1975; McINTOSH, 1994; VANLERBERGHE & McINTOSH, 1997). Nesta planta o calor é produzido e liberado em flores efêmeras durante um único dia de floração, volatilizando aromas com o objetivo de atrair insetos polinizadores (MEEUSE, 1975; McINTOSH, 1994; WAGNER *et al.* 2008). No entanto, sabe-se que a expressão da AOX pode ser também induzida por condições de estresse, tais como ataques por patógeno (LENNON *et al.*, 1997; SIMONS *et al.*, 1999), senescência e amadurecimento de frutos (PURVIS, 1997), além da exposição ao frio (VANLERBERGHE & McINTOSH, 1992; GONZÁLEZ-MELER *et al.*, 1999; CALEGARIO *et al.*, 2003). Tem sido sugerido, ainda, que a via da AOX é estimulada com o objetivo de impedir a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) em mitocôndrias ativamente oxidando substratos (MAXWELL *et al.*, 1999; MØLLER, 2001).

A AOX tem sido proposta como um marcador funcional de tolerância ao estresse em algumas variedades de plantas. Estudos sugerem que a estrutura dos genes polimórficos da AOX é suficiente para permitir o desenvolvimento de marcadores desta proteína em muitas espécies de plantas (ARNHOLDT-SCHMITT *et al.*, 2006; FREDERICO *et al.*, 2009a,b; MACEDO *et al.*, 2009). A resposta diferencial dos genes da AOX ao estresse pode fornecer um plano flexível de defesa da planta, pois, a proteína atua na mitocôndria como um sistema de dissipação de energia (ARNHOLDT-SCHMITT *et al.*, 2006; FREDERICO *et al.*, 2009b). Uma vez que o gene da enzima é nuclear, sua indução permite a comunicação entre a mitocôndria e o núcleo, para proteger as células sob condições de estresse respiratório (CAMPOS *et al.*, 2009).

Os genes da AOX podem ser divididos em dois grupos *aox1* (a-d) e *aox2* (SAISHO *et al.*, 1997; CONSIDINE *et al.*, 2002; CLIFTON *et al.*, 2006; RASMUSSEN *et al.*, 2009). Em *A. thaliana*, os genes da *aox1* são encontrados na região interna do cromossomo 3 (AOX1a, b, c) e cromossomo 1 (AOX1d)

enquanto que gene da *aox2* está localizado na região da extremidade do cromossomo cinco (COSTA *et al.*, 2009; SAISHO *et al.*, 1997).

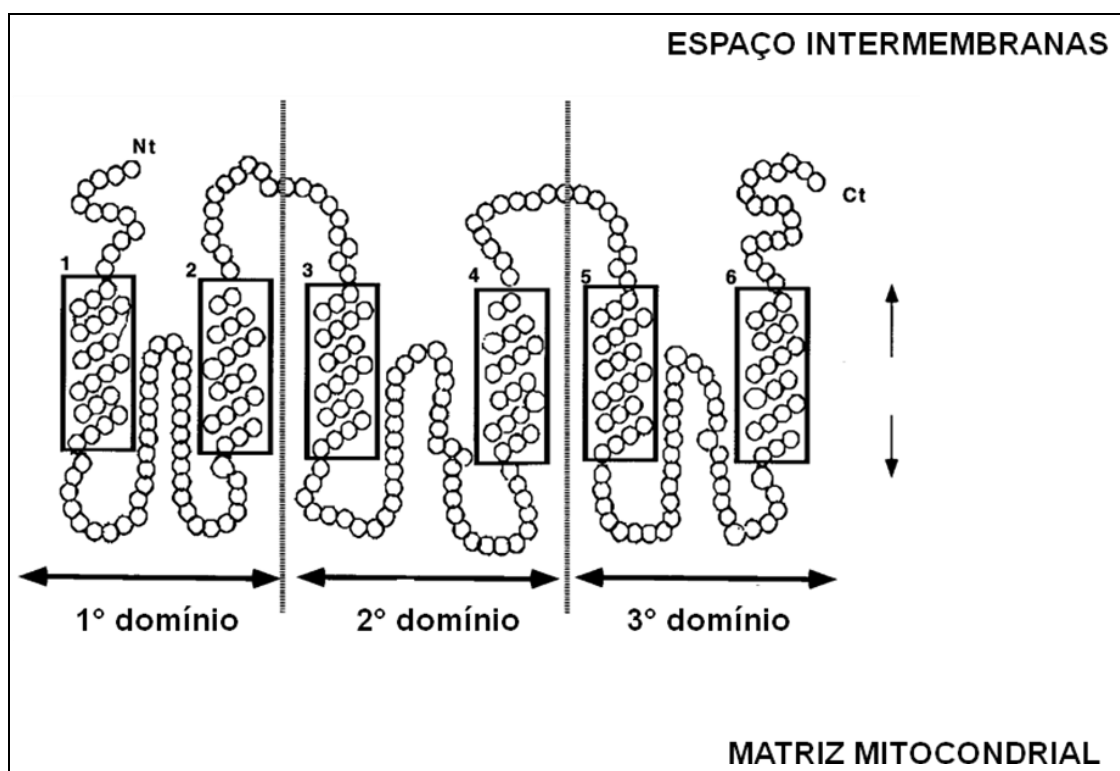
Os genes mais estudados são os membros da família *aox1*, presentes nas angiospermas (mono e dicotiledôneas) e em gimnospermas, sendo regulados de maneira diferenciada nos diversos órgãos e estádios de desenvolvimento, além de responderem ao estresse (CONSIDINE *et al.*, 2002; BORECKÝ *et al.*, 2006; FREDERICO *et al.*, 2009a). Os genes da *aox1*, encontrados em monocotiledôneas, são muito divergentes e possuem pouca similaridade com os genes de dicotiledôneas e gimnospermas (FREDERICO *et al.*, 2009a).

Por outro lado, a *aox2* possui maior expressão gênica constitutiva (CONSIDINE *et al.*, 2002), mas também foi encontrada em resposta ao estresse em algumas espécies de plantas como o feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*) (COSTA *et al.*, 2007; COSTA *et al.*, 2010) sendo identificada nas gimnospermas pinheiro manso (*Pinus pinea*) e cedro japonês (*Cryptomeria japonica*) (FREDERICO *et al.*, 2009a) e em dicotiledôneas, mas não em monocotiledôneas (CONSIDINE *et al.*, 2002; BORECKÝ *et al.*, 2006; POLIDOROS *et al.*, 2009). O fato de ter sido identificada uma sequência para a AOX2 em uma gimnosperma e não nas dicotiledôneas indica que um ancestral comum das gimnospermas e angiospermas possuía o gene da *aox2*. Seguindo este raciocínio, Frederico e colaboradores (2009a) sugeriram que as monocotiledôneas tenham perdido o gene da *aox2* e não que as dicotiledôneas o tenham adquirido durante a evolução.

Borecký e colaboradores (2006) propuseram a existência de uma terceira família da AOX (*aox3*). Em estudos com *Arabidopsis* exposta a baixas temperaturas (4°C), os autores observaram que o gene *aox1d* sofria regulação negativa em relação aos demais genes identificados da família *aox1*. Devido a este padrão de resposta, sugeriu-se que este gene pertença a uma terceira família, a AOX3. A divergência entre os perfis de expressão das AOX, em tecidos e órgãos específicos, sugere que cada família desta proteína possa desempenhar funções fisiológicas diversas nas diferentes espécies de plantas (CONSIDINE *et al.*, 2002; BORECKÝ *et al.*, 2006; CAMPOS *et al.*, 2009).

### 2.2.3 Proteína Desacopladora de Plantas (UCP ou PUMP)

A dissipação de energia em mitocôndrias de plantas também pode ser mediada pela proteína desacopladora de plantas (UCP ou PUMP) (VERCESI *et al.*, 1995; VERCESI *et al.*, 2006). As PUMPs são proteínas integrais de membrana, são monômeros com massa molecular variando entre 30 e 33 kDa e com cerca de 300 aminoácidos. Esses aminoácidos estão dispostos em uma estrutura que possui 3 domínios homólogos, cada um desses domínios compreende duas  $\alpha$ -hélices transmembranas (BORECKÝ *et al.*, 2001; VERCESI *et al.*, 2006) (Figura 5).



**FIGURA 5. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA PUMP NA MEMBRANA MITOCONDRIAL INTERNA**

FONTE: Fleury & Sanchis (1999).

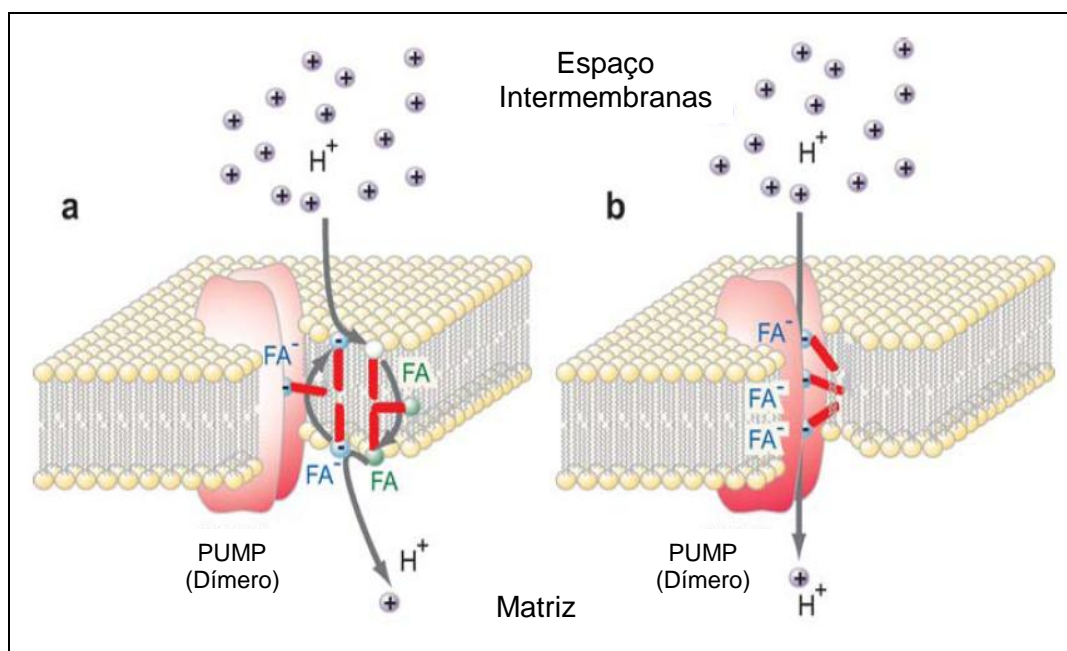
NOTA: A PUMP é formada por três domínios com cerca de 100 aminoácidos e com duas regiões transmembranas. Os três domínios possuem similaridade em suas sequências e estruturas. Os retângulos indicam as hélices transmembranas (numeradas 1-6). Nt e Ct indicam, respectivamente, as extremidades amino e carboxi terminais da proteína.

Segundo Vercesi e colaboradores (1995) a PUMP possui características e massa molecular muito similares à proteína desacopladora (UCP1) de



mamíferos. Inicialmente, a PUMP foi isolada de mitocôndrias de tubérculos de batata (*Solanum tuberosum*) (VERCESI *et al.*, 1995) e tomate (*Solanum lycopersicum*) (JESEK *et al.*, 1997). Atualmente são descritas seis proteínas pertencentes à família das PUMPs presentes no genoma de *Arabidopsis thaliana* (ecótipo Columbia - Col-0) e cinco pertencente à cana de açúcar (*Saccharum* sp. cultivar SP80-3280) (BORECKÝ *et al.* 2006; FIGUEIRA & ARRUDA, 2011).

Estas proteínas são capazes de transportar prótons para a matriz mitocondrial sem que haja a síntese de ATP e, desta maneira, promovem a diminuição do gradiente eletroquímico de prótons. São sugeridos dois mecanismos pelos quais as PUMPs promovem esta reentrada de prótons: a) Modelo Protonoforético e b) Modelo Tamponante (KLINGENBERG, 1990; WINKLER & KLINGENBERG, 1994) (Figura 6).



**FIGURA 6. MODELOS PROPOSTOS PARA O TRANSPORTE DE PRÓTONS PELA PUMP PARA A MATRIZ MITOCONDRIAL**

FONTE: Vercesi *et al.*, (2006).

NOTA: a) Modelo Protonoforético; b) Modelo Tamponante. FA (ácido graxo) é representada como uma molécula (protonada) neutra com a cabeça hidrofílica em verde, ou como ânion (desprotonada) com a cabeça em azul; as caudas hidrofóbicas estão em vermelho.

O modelo protonoforético propõe um mecanismo de “flip-flop” (SKULACHEV, 1991). Neste, os ácidos graxos aniônicos distribuem-se na membrana mitocondrial com seus grupamentos hidrofílicos abaixo do nível das outras cabeças lipídicas, difundindo-se lateralmente na membrana e alcançando o sítio de ligação na PUMP (GARLID *et al.*, 1996). A PUMP catalisa o transporte de ânions, deixando o grupamento hidrofílico exposto para o citoplasma. No exterior da mitocôndria, os AG desligam-se da proteína e se difundem lateralmente na membrana, são protonados e na forma neutra retornam rapidamente para a matrix mitocondrial pelo mecanismo chamado de “flip-flop”, resultando em um ciclo fútil (GARLID *et al.*, 1996). No segundo modelo a PUMP age com um canal que transporta os  $H^+$  e os AG não são translocados através da membrana (KLINGENBERG, 1990).

As PUMPs possuem funções fisiológicas relacionadas à sua capacidade desacopladora e ao metabolismo específico de cada tecido (VERCESI *et al.*, 2006). Dentre estas funções destacam-se: controle da geração das espécies reativas de oxigênio (ROS) na mitocôndria (SKULACHEV, 1996), termogênese (NICHOLLS & RIAL, 1999), a regulação do metabolismo energético (SLUSE *et al.*, 1998; SLUSE & JARMUSZKIEWICZ, 2000) e resposta ao estresse (MØLLER, 2001). Em relação ao controle da produção mitocondrial de ROS, sabe-se que tais espécies são geradas durante a transição do estado 3 para 4 da respiração, quando o gradiente eletroquímico de prótons é máximo, o que favorece a redução parcial do oxigênio a ânion superóxido. Por sua vez, o peróxido de hidrogênio formado deste radical em presença de ferro pode levar a formação do radical hidroxila, espécie mais reativa, através da reação de Fenton. Uma vez que as PUMPs diminuem o potencial eletroquímico de prótons, ao permitir a reentrada destes na matriz mitocondrial, acredita-se que estas proteínas atuariam no controle dos níveis ROS, tanto em situações fisiológicas ou em diferentes tipos de estresse. Desta maneira as PUMPs participariam de um mecanismo de feedback negativo pelo qual limitariam a produção de ROS pela mitocôndria (SKULACHEV, 1996; KOWALTOWSKI *et al.*, 1998; VERCESI *et al.*, 2006; NOGUEIRA *et al.*, 2011).

As PUMPs são ativadas por ácidos graxos de cadeia longa como os ácidos linoleico, oléico, linolênico, palmítico, mirístico e inibidas por BSA e por

nucleotídeos derivados de guanina ou adenina como o ATP, GTP, GDP e ADP (VERCESI *et al.*, 2006). Neste contexto, Kowaltowski e colaboradores (1998), em estudos realizados com mitocôndrias de tubérculos de batata (*Solanum tuberosum*), demonstraram que a ativação da PUMP, pela adição de ácido linoleico, causou uma diminuição nos níveis de  $H_2O_2$ . Já a inibição da proteína, pela presença de albumina, promoveu um aumento nos níveis deste ROS. Resultado similar foi demonstrado por Paventi e colaboradores (2006) em tubérculos de alcachofra de Jerusalém (*Helianthus tuberosus* L.) onde a ativação da PUMP por AG também promoveu diminuição da produção de ROS. A ativação ou a superexpressão da PUMP diminui a produção de ROS e melhora a tolerância ao estresse oxidativo (BRANDALISE *et al.*, 2003). Este efeito foi verificado em plantas transgênicas de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv SR1) com aumento da expressão da PUMP em que houve uma melhora na defesa contra ROS. Estes resultados fornecem evidências do papel protetor da PUMP contra os danos do estresse oxidativo (BRANDALISE *et al.*, 2003).

Sabe-se que a atividade da PUMP também é estimulada por  $O_2^{\bullet-}$  e ou produtos da peroxidação lipídica (CONSIDINE *et al.*, 2003; MURPHY *et al.*, 2003; SMITH *et al.*, 2004) o que reforça o papel desta proteína do controle da produção de ROS. Além disso, a indução do estresse oxidativo pela presença de  $H_2O_2$  promoveu o aumento da expressão dos genes da PUMP em diferentes espécies de plantas (DESIKAN *et al.*, 2001; BRANDALISE *et al.*, 2003; BEGCY *et al.*, 2011).

Diversos estudos também têm sido voltados para a identificação dos genes das PUMPs em diferentes espécies de plantas. Laloi e colaboradores em 1997, identificaram em tubérculo de batata (*S. tuberosum*) o gene que codifica para esta proteína denominado StUCP. Posteriormente, Maia *et al.* (1998) identificaram o gene AtPUMP da *Arabidopsis*, que exibe similaridade com a StUCP de tubérculo de batata (*S. tuberosum*). Posteriormente, foram identificados no genoma de *Arabidopsis* seis genes que codificam para a PUMP (AtPUMP1-6) e no genoma de cana de açúcar (*Saccharum* sp. cultivar SP80-3280) foram encontrados cinco homólogos (SsPUMP1-5) (VETTORE *et al.*, 2003; BORECKÝ *et al.*, 2006; VERCESI *et al.*, 2006). O alinhamento da sequência de aminoácidos da PUMP de *Arabidopsis thaliana* (AtUCP) e tubérculos de batata (*S. tuberosum*) (StUCP) com a sequência da UCP de

mamíferos mostra que essas proteínas possuem 41% e 44% de similaridade com a UCP1, respectivamente e 46% (*AtUCP*) e 47% (*StUCP*) de similaridade com a UCP2 (RICQUIER & BOUILLAUD, 2000; LALOI *et al.*, 1997).

As famílias de genes da PUMP são expressas diferencialmente em condições de estresses específicos, o que implica que distintos padrões de regulação da expressão devem existir para cada gene. Um exemplo é a PUMP de *Arabidopsis* onde ocorrem diferentes perfis de expressão em resposta ao estresse por baixa temperatura: a *AtPUMP1* é sensível ao frio, já a *AtPUMP2* não é responsiva (BORECKÝ *et al.*, 2006).

Uma pesquisa feita com os genes da PUMP de *Arabidopsis* usando diferentes conjuntos de dados de microarranjos confirmou que a expressão destas proteínas é afetada diferencialmente. Como por exemplo, a redução da expressão da *AtUCP1* que resultou na baixa oferta de nutrientes e a *AtUCP2* que teve uma diminuição da expressão em resposta a hipóxia. Adicionalmente, observou-se que o aumento da expressão da *AtUCP1* ocorreu em condições de depleção de potássio e tratamento por baixas temperaturas. Por outro lado, a *AtUCP2* mostrou níveis de expressão aumentada em resposta a presença de ácido giberélico (GA). Apesar das mudanças observadas, as alterações mais significativas nos níveis de expressão de ambos os genes, *AtUCP1* e *AtUCP2* (aumento ou diminuição da expressão), ocorreu em resposta aos estresses bióticos, induzido por fungos, bactérias, nematóides e insetos. Já o gene *AtUCP3*, expresso constitutivamente, manteve-se praticamente inalterado nos diferentes estresses (NOGUEIRA *et al.*, 2011).

As proteínas PUMP e AOX exibem similaridades funcionais, pois ambas são dissipadoras de energia (SIEDOW & BERTHOLD, 1986; VERCESI *et al.*, 1995; WAGNER & KRAB, 1995; PINHEIRO *et al.*, 2004) e protetoras contra ROS. Além disso, PUMP e AOX são estimuladas por diferentes condições de estresse, porém, de maneira diferenciada (ELTHON *et al.*, 1986; NANTES *et al.*, 1999; VERCESI *et al.*, 2006; FIGUEIRA & ARRUDA, 2011). Em geral, PUMP e AOX não são expressas simultaneamente nos mesmos níveis nos mesmos tecidos, e o nível de cada proteína varia em cada condição de estresse (FIGUEIRA & ARRUDA, 2011). PUMP e AOX são reguladas de modo inverso pelos AG livres. Enquanto a primeira é ativada pelo aumento da concentração de AG, a segunda é inibida, sugerindo que as proteínas não

podem expressar a atividade máxima simultaneamente (SLUSE *et al.*, 1998). Em tomates verdes (*Lycopersicon esculentum*), PUMP e AOX estão presentes, mas estas proteínas não estão ativas simultaneamente, pois os AG livres bloqueiam a atividade da AOX enquanto ativam a atividade da PUMP (SLUSE & JARMUSZKIEWICZ, 2000).

A existência de famílias de genes que codificam as isoformas da PUMP e AOX indicam que estas proteínas podem ter se originado por duplicação cromossômica, e que esta evolução ocorreu para atender a demanda do metabolismo mitocondrial dos diversos tipos de células, tecidos e órgãos (FIGUEIRA & ARRUDA, 2011).

## 2.3 ESTRESSE

Estresses representam um dos principais fatores limitantes para a produtividade agrícola. Como as plantas são organismos incorporados ao solo, estão expostas as condições ambientais, sofrendo constantemente as ações de diferentes estresses que alteram o seu metabolismo, crescimento e produtividade (DAT *et al.*, 2000; KEEGSTRA & THOMASHOW, 2002; VRANOVA *et al.*, 2002; HOEBERICHTS & WOLTERING, 2003; NOGUEIRA, 2004).

Conceitua-se como estresse qualquer fator que promova uma situação desvantajosa para a planta, sendo frequentemente relacionado ao processo de aclimação ao meio. Estresses abióticos (salinidade, extremos de temperatura, radiação ultravioleta e osmolaridade) e estresses bióticos (patógenos) induzem a padrões de respostas semelhantes nas plantas, sendo que as células necessitam se adaptar a estas novas condições impostas de clima, temperatura e solo (CHERRY, 1994; FOYER *et al.*, 1997; NOGUEIRA, 2004; REDDY *et al.*, 2004; TAYLOR *et al.*, 2005; PASTORE *et al.*, 2007). Em resposta as condições de estresse, ocorrem alterações transientes da expressão gênica e a síntese de compostos específicos (KEEGSTRA & THOMASHOW, 2002; NOGUEIRA *et al.*, 2003; REDDY *et al.*, 2004; TAYLOR *et al.*, 2005).

Extremos de temperatura são considerados um dos principais estresses ambientais. Entretanto, cada planta pode responder de forma diferenciada as variações de temperatura, pois, uma determinada condição ambiental que é desfavorável para uma planta, pode não o ser para outra. Cada espécie possui uma temperatura ideal de crescimento e, a sua distribuição geográfica é baseada na temperatura onde a planta é capaz de sobreviver. Enquanto plantas de clima temperado ou frio suportam temperaturas de aproximadamente -30°C durante o inverno, já as plantas de clima equatorial ou quente suportam temperaturas de até 60°C durante o verão, sem apresentarem sintomas de estresse (TAIZ & ZEIGER, 2009; THOMASHOW, 1999).

O estresse pelo frio, entre outros, pode promover um aumento na produção de ROS, resultando numa situação de estresse oxidativo. As ROS, por sua vez, podem atuar como indutores de mecanismos de tolerância ao estresse e/ou como agentes causadores de injúrias e morte celular (PRASAD *et al.*, 1994; NOGUEIRA, 2004; TAYLOR *et al.*, 2005; RHOADS *et al.*, 2006; PASTORE *et al.*, 2007). Neste contexto, estudos propõem que o aumento da atividade dos sistemas antioxidantes das plantas está fortemente relacionado com aumento da tolerância ao estresse (PRASAD *et al.*, 1994; MØLLER & KRISTENSEN, 2004; TAYLOR *et al.*, 2005; RHOADS *et al.*, 2006; PASTORE *et al.*, 2007).

Em plantas sensíveis ao frio como a cana de açúcar (*Saccharum officinarum*), o estresse causado pelas baixas temperaturas, ocasiona um aumento de ROS ( $O_2^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2$ ,  $^{\bullet}OH$ ), que podem interagir com DNA, lipídeos e proteínas e causar danos celulares. Nas membranas celulares, ROS podem promover lipoperoxidação e frequentemente a ativação do programa de morte celular programada (TAI & LENTINI, 1998; KOWALTOWSKI & VERCESI, 1999; MØLLER & KRISTENSEN, 2004; RHOADS *et al.*, 2006).

## 2.4 PRODUÇÃO DE ROS E DEFESAS ANTIOXIDANTES

Durante o evento da respiração celular, em todos os organismos, inclusive nas plantas, pode ocorrer a formação de ROS, como o radical

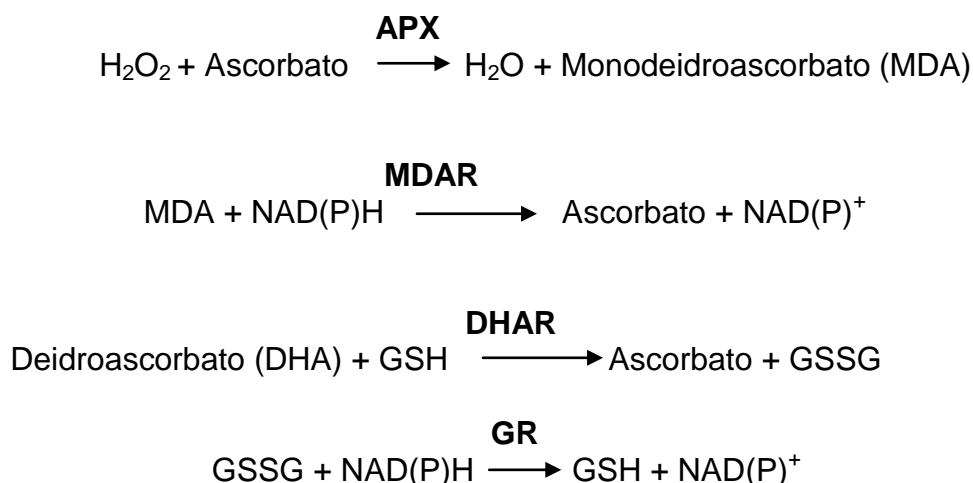
superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), radical hidroxila ( $^{\bullet}OH$ ) e oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) (NAVROT *et al.*, 2007). Aproximadamente de 1% a 5% do total do oxigênio consumido pelas células vegetais é direcionado para a produção de ROS, sendo os complexos I e III da cadeia respiratória mitocondrial os principais locais de sua formação (PUNTARULO *et al.*, 1988; MØLLER, 2001).

Nas plantas, os cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos desempenham um importante papel nos mecanismos de resposta ao estresse (APEL & HIRT, 2004; MITTLER *et al.*, 2004; SCHWARZLÄNDER *et al.*, 2009). Grande parte das ROS originam-se nos cloroplastos e peroxissomos, mas na ausência de luz, a produção de ROS é predominantemente mitocondrial (MAXWELL *et al.*, 1999; FOYER & NOCTOR, 2003; NAVROT *et al.*, 2007).

Diferentes situações levam à formação de ROS, entre estas: o estresse osmótico, a senescência (MAXWELL *et al.*, 2002; MITTOVA *et al.*, 2004), o estresse por baixas temperaturas e o déficit hídrico (CALEGARIO *et al.*, 2003; PINHEIRO *et al.*, 2004; PASTORE *et al.*, 2007), a exposição à radiação ultravioleta (APEL & HIRT, 2004) e o ataque por patógenos (KUZNIAK & SKLODOWSKA, 2004). As plantas possuem algumas estratégias de defesa contra estes estresses como: prevenir a produção e/ou promover a remoção de ROS e reparar os danos causados por estas espécies (MØLLER, 2001). Como já mencionado, para diminuir a produção de ROS a cadeia respiratória mitocondrial conta com a proteína desacopladora de planta (PUMP) (VERCESI *et al.*, 1995; KOWALTOWSKI *et al.*, 1998), a oxidase alternativa (AOX) (MAXWELL *et al.*, 1999) e NAD(P)H desidrogenases alternativas (MØLLER, 2001). Ainda, contribuem para a redução dos níveis de ROS, os mecanismos antioxidantes não-enzimáticos e enzimáticos de proteção (APEL & HIRT, 2004).

Os mecanismos antioxidantes não enzimáticos incluem: ascorbato, glutathione (GSH), tocoferol, flavonóides, alcalóides e carotenóides. Enquanto GSH é oxidada por ROS, formando glutathione oxidada (GSSG), o ascorbato é oxidado à monodeidroascorbato (MDA) e deidroascorbato (DHA). Através do ciclo ascorbato-glutathione (Figura 7), GSSG, MDA e DHA podem ser reduzidos novamente a GSH e ascorbato, respectivamente (APEL & HIRT, 2004). O

estado reduzido dos antioxidantes é mantido pela deidroascorbato redutase (DHAR) glutaciona redutase (GR), monodeidroascorbato redutase (MDAR), sendo que as duas últimas utilizam NADPH como fonte de equivalentes redutores (TSUGANE *et al.*, 1999; APEL & HIRT, 2004).



#### FIGURA 7. CICLO ASCORBATO-GLUTATIONA

FONTE: Apel & Hirt (2004).

NOTA: O peróxido de hidrogênio é convertido a água pelo ciclo ascorbato-glutationa. O agente redutor na primeira reação, catalisada pela ascorbato peroxidase (APX), é o ascorbato, que se oxida em monodeidroascorbato (MDA). A MDA redutase (MDAR) reduz MDA a ascorbato com a participação do NAD(P)H. Deidroascorbato (DHA) pode ser produzido espontaneamente a partir do MDA e ser reduzido a ascorbato pela DHA redutase (DHAR) com a oxidação de GSH a GSSG. O ciclo é concluído com a redução da GSSG pela glutaciona redutase (GR), com a utilização de equivalentes redutores provenientes do NAD(P)H.

Em plantas, os mecanismos enzimáticos de defesa contra ROS incluem ascorbato peroxidase (APX), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutaciona peroxidase (GPX) e redutase (GR) (Figura 8). A eliminação de ROS ocorre primeiramente com a ação da SOD, que catalisa a dismutação do  $\text{O}_2^{\bullet-}$  a  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Posteriormente, como outra linha de defesa, atuam a catalase, APX e GPX detoxificando o  $\text{H}_2\text{O}_2$  e formando  $\text{H}_2\text{O}$  (APEL & HIRT, 2004). Apesar de a catalase e APX atuarem na remoção de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , possuem diferentes afinidades pelo seu substrato. Enquanto a CAT é capaz de remover o  $\text{H}_2\text{O}_2$  em concentrações milimolares, a APX o faz em concentrações micromolares. Com base nesta diferença, sugere-se que a catalase seja responsável pela remoção do excesso de ROS durante o estresse. Já a APX atuaria na modulação fina

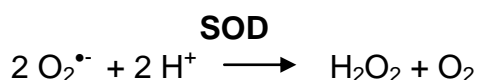


dos níveis de ROS, estando sua atividade relacionada aos processos de sinalização por estas espécies celulares (MITTLER, 2002). Ainda, a APX requer um sistema de regeneração de ascorbato e glutatona (Figura 7).

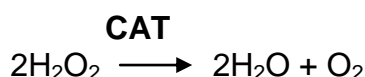
### Glutationa Peroxidase



### Superóxido Dismutase



### Catalase



## FIGURA 8. PRINCIPAIS MECANISMOS ENZIMÁTICOS DE DEFESA CONTRA ROS EM PLANTAS

FONTE: Apel & Hirt (2004).

NOTA: A glutatona peroxidase (GPX) reduz o  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$  as custas da oxidação de GSH a GSSG; a superóxido dismutase (SOD) catalisa a dismutação do radical superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) a peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e a catalase (CAT) reduz  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$ .

As células vegetais possuem múltiplos genes codificadores de SOD, CAT, APX e GR. Isoformas diferentes são especificamente direcionadas para mitocôndrias, cloroplastos, peroxissomos e citosol (BOWLER *et al.*, 1992; SCANDALIOS, 1993; NOCTOR & FOYER, 1998; DUTILLEUL *et al.*, 2003; MITTLER *et al.*, 2004; GECHEV *et al.*, 2006; MØLLER *et al.*, 2007). Em relação à SOD, por exemplo, sabe-se que as isoformas dependentes de manganês (MnSOD) e ferro (FeSOD) se encontram nas mitocôndrias e cloroplastos, respectivamente, enquanto que a isoforma dependente de cobre/zinco (Cu/ZnSOD) é encontrada em cloroplastos, citosol, e peroxissomos (BOWLER *et al.*, 1992; DUTILLEUL *et al.*, 2003). As SOD podem, ainda, apresentar vários genes para cada uma das isoformas, como no genoma de *A. thaliana* em que os genes da SOD são divididos em um gene para a MnSOD (*msd1*), três para

a FeSOD (*fsd1*, *fsd2* e *fsd3*) e três para a Cu/ZnSOD (*csd1*, *csd2* e *csd3*) (SCANDALIOS *et al.* 1997; KLIEBENSTEIN *et al.*, 1999; MITTLER *et al.*, 2004). Já para a catalase de milho (*Zea mays*) e de *Arabidopsis* são encontradas 3 isoformas diferentes a *cat1*, *cat2* e *cat3*. Estas são encontradas em diferentes organelas e são expressas de maneira diferente e independente para cada gene *cat1* e *cat2* estão localizadas nos peroxissomos e citosol, enquanto que *cat3* está presente na mitocôndria (HAVIR & McHALE, 1989; DAT *et al.*, 2000; MITTLER *et al.*, 2004).

Nas células, a dimensão do estresse oxidativo é determinada pelas quantidades de  $H_2O_2$ ,  $O_2^{\bullet-}$  e  $\bullet OH$ . Por isso, as respostas das enzimas antioxidantes são tão importantes para a diminuição dos níveis tóxicos de ROS. Mudanças nestas respostas induzem a mecanismos compensatórios. Por exemplo, quando a atividade da catalase é reduzida em plantas, as enzimas APX e GPX são expressas em maiores quantidades (APEL & HIRT, 2004).

Embora as ROS sejam vistas como um produto tóxico do metabolismo celular, um número crescente de evidências sugere que estas atuem como segundo mensageiro e na regulação de genes (JABS, 1999; DESIKAN *et al.*, 2001; APEL & HIRT, 2004; AHMAD *et al.*, 2008). Pesquisas feitas nos últimos anos mostraram que as plantas produzem ROS como moléculas de sinalização para controle de processos, tais como a morte celular programada, o desenvolvimento da planta, as respostas ao estresse abiótico, a defesa contra patógenos e a sinalização sistêmica (MITTLER, 2002; APEL & HIRT, 2004; GECHEV & HILLE, 2005; GAPPER & DOLAN, 2006; TAIZ & ZEIGER, 2009). Essas moléculas podem atuar ativando proteínas ou induzindo a transcrição de genes (DESIKAN *et al.*, 2001; NAVROT *et al.*, 2007). Este sistema de sinalização também interage com outras vias, como as MAPKs e  $Ca^{2+}$  (NAVROT *et al.*, 2007; RODRIGUEZ *et al.*, 2010). Como ROS ativam a cascata de sinalização MAPK, sugere-se que esta via ajude na mediação da tolerância ao estresse nas plantas (AHMAD *et al.*, 2008; RODRIGUEZ *et al.*, 2010).

Para entender como as ROS atuam é importante conhecer a regulação de ROS nos diferentes compartimentos celulares, como nas mitocôndrias, cloroplastos e peroxissomos, assim como nas diferentes fases do desenvolvimento celular (APEL & HIRT, 2004; GECHEV *et al.*, 2006). Torna-se

cada vez mais claro que a especificidade da resposta biológica aos níveis alterados de ROS depende de múltiplos fatores como as características da ROS envolvida, a intensidade do sinal, a etapa de desenvolvimento da planta, o tipo de estresse, a interação com outras moléculas sinalizadoras como o óxido nítrico, mensageiros lipídicos e hormônios (GECHEV & HILLE, 2005; ZANINOTTO *et al.*, 2006; KWAK *et al.*, 2006; GECHEV *et al.*, 2006).

A geração de ROS que ocorre nos diferentes compartimentos celulares, resulta em mudanças do transcriptoma nuclear, indicando que essa informação deve ser transmitida para o núcleo a partir das organelas das plantas. Três principais mecanismos indicam como as ROS podem afetar a expressão dos genes: sensores de ROS podem ser ativados para induzir a cascata de sinalização; os componentes das vias de sinalização podem ser diretamente oxidados por ROS; finalmente, ROS podem mudar a expressão de genes modificando a atividade de fatores de transcrição (APEL & HIRT, 2004).

Entre as ROS, o  $H_2O_2$  é uma das moléculas mais estudadas e evidências indicam que este funciona como uma molécula de sinalização devido à sua maior estabilidade e maior meia vida (DESIKAN *et al.*, 2001; HUNG *et al.*, 2005). Ainda, o  $H_2O_2$  é uma das primeiras moléculas de resposta celular induzindo a expressão de genes relacionados com as defesas das plantas (VRANOVÁ *et al.*, 2002). Além disso, o  $H_2O_2$  também ativa proteínas quinases (MAPKs) e é um fator chave na morte celular programada (MITTLER *et al.*, 1999; DESIKAN *et al.*, 2001; VRANOVÁ *et al.*, 2002; GECHEV & HILLE, 2005).

### 3. JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS

Apesar da *A. angustifolia* ser uma espécie nativa de reconhecida importância socioeconômica e ambiental, não se dispõe, até o momento, de maneiras eficientes para seu plantio comercial ou cultivo em larga escala, apesar dos muitos estudos direcionados ao melhoramento genético da espécie. O conhecimento dos fatores fisiológicos e bioquímicos que influenciam o crescimento e o desenvolvimento da araucária é essencial para o entendimento do comportamento da espécie frente a diferentes condições ambientais, fornecendo subsídios para a sugestão de práticas de reflorestamento e regeneração natural.

A exposição a condições ambientais adversas, como baixas temperaturas, causa estresse em muitas plantas induzindo a um padrão de respostas celulares, que inclui o aumento na produção de ROS. Estas, por sua vez, podem atuar tanto como indutoras de mecanismos de tolerância ao estresse, quanto como agentes causadores de injúrias e morte celular. As mitocôndrias têm papel fundamental na resposta celular ao estresse oxidativo, uma vez que dispõem de mecanismos capazes de prevenir a formação de ROS ou promover sua remoção, nomeadamente: as enzimas AOX, PUMP e NAD(P)H desidrogenase alternativas, bem como as enzimas antioxidantes, como a catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX); superóxido dismutase (SOD) e glutatona redutase (GR).

O objetivo geral deste estudo foi caracterizar o papel das mitocôndrias na resposta ao estresse pelo frio em células embriogênicas de *A. angustifolia*, visando contribuir para o conhecimento dos mecanismos relacionados à adaptação climática desta planta. Ainda, considerando a importância da AOX nas condições de estresse, em particular o oxidativo e, o fato de que não se conhece sua sequência genômica nesta espécie, foi também objetivo deste estudo sequenciar o gene desta proteína.

Foram objetivos específicos deste estudo:

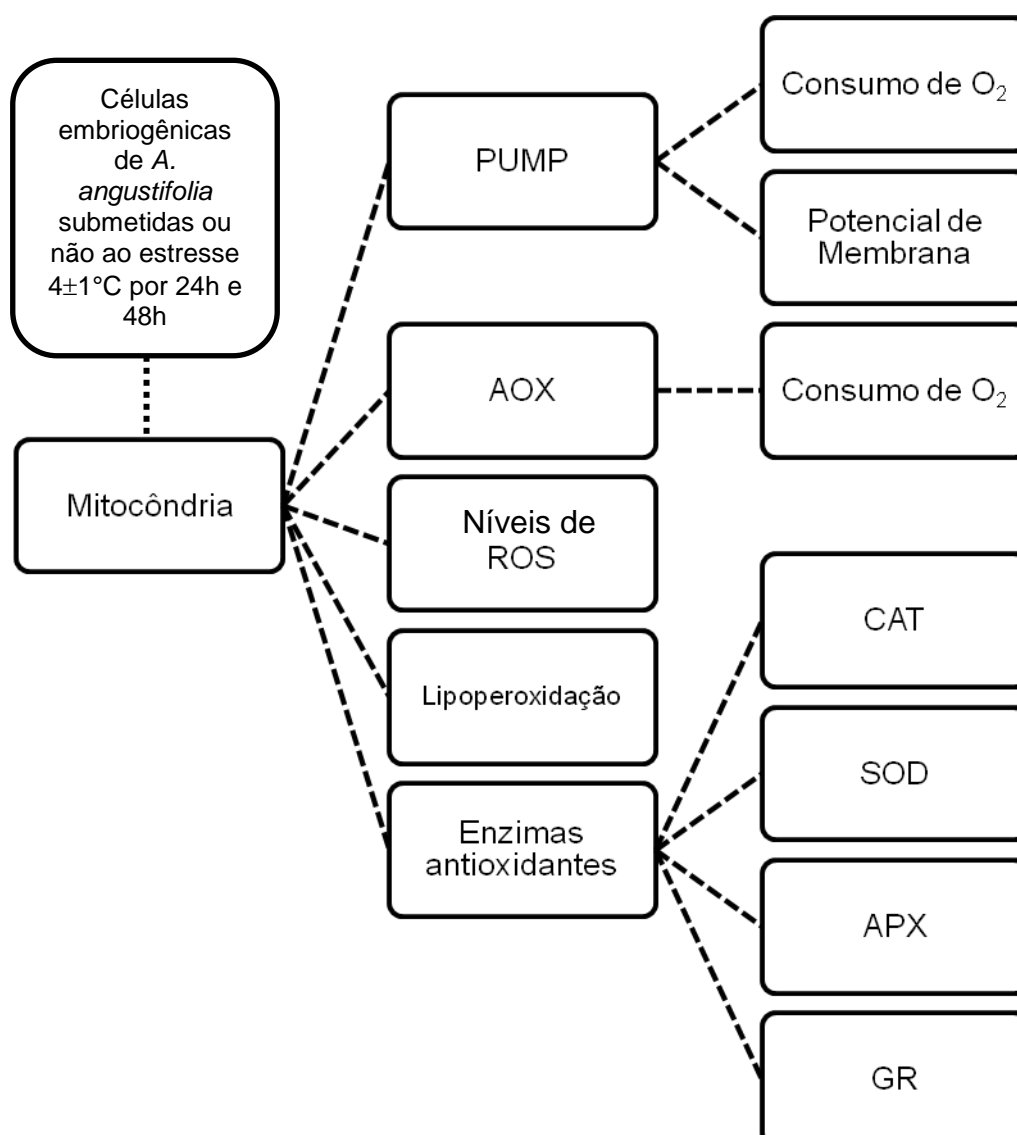
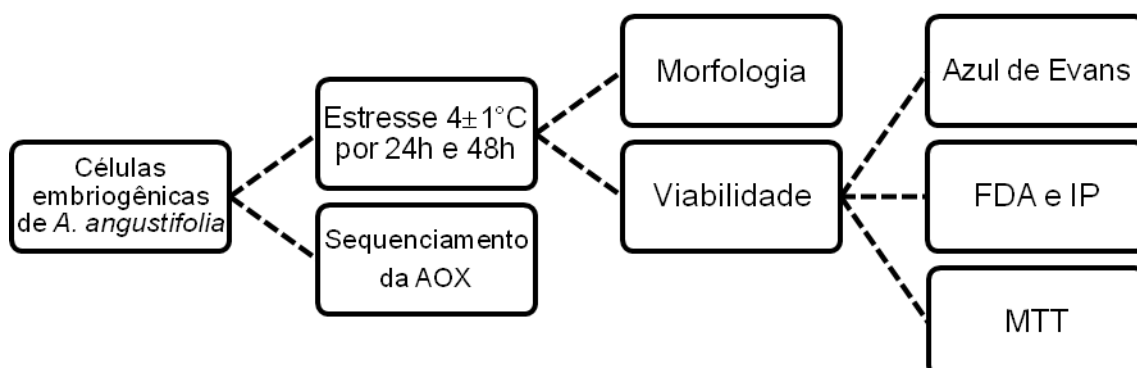
Em culturas de células embriogênicas de *A. angustifolia* submetidas ou não ao estresse por variação de temperatura (4°C por 24 h ou 48 h) avaliar a morfologia e a viabilidade celular.

Em mitocôndrias isoladas de células embriogênicas de *A. angustifolia*, submetidas ou não ao estresse por variação de temperatura (4°C por 24 h ou 48 h) avaliar:

- a) A atividade da PUMP e AOX;
- b) A atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX); superóxido dismutase (SOD) e glutathione redutase (GR);
- c) Os níveis de ROS;
- d) A lipoperoxidação;

Em culturas de células embriogênicas de *A. Angustifolia* não submetidas ao estresse identificar a sequência do gene da AOX.

#### 4. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL



## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 REAGENTES

HEPES, EGTA, EDTA, D-manitol, ácido glutâmico, ácido málico, ácido succínico, NADH, NADPH, ATP, ADP, FCCP, rotenona, BSA desprovida de ácidos graxos, SHAM, piruvato, safranina O, oligomicina, atractilosídeo, propranolol, ácido linoléico,  $MgCl_2$ , TBA,  $FeCl_3$ , Tris, glutathione oxidada, mio-inositol, ácido nicotínico, glutamina, piridoxina-HCl, glicina, tiamina-HCl, L-glutamina, 2,4-D, BAP, cinetina, phytigel, caseína hidrolisada e MTT foram adquiridos da Sigma Aldrich Inc<sup>®</sup> (EUA).  $CaCl_2$ , KOH, cisteína, KCl, fosfato de sódio e potássio, TCA, HCl e DMSO foram adquiridos da Merck<sup>®</sup> do Brasil. O FDA e IP foram adquiridos da Molecular Probes<sup>®</sup> (Oregon, USA).

Os demais reagentes utilizados foram do melhor grau analítico comercialmente disponível. As soluções foram preparadas com água ultrapura (MilliQ<sup>®</sup>).

A cultura inicial das células embriogênicas de *A. angustifolia*, originada a partir do tecido de embriões zigóticos, foi gentilmente cedida pelo professor Dr. Miguel Pedro Guerra do Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal do Departamento de Fitotecnia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina.

### 5.2 CULTIVO E MANUTENÇÃO DAS CÉLULAS EMBRIOGÊNICAS DE *Araucaria angustifolia*

As células embriogênicas originadas a partir de tecido de embrião zigótico de *A. angustifolia*, foram cultivadas em meio de cultura semi-sólido básico (BM) (GUPTA & PULLMAN, 1991), suplementado com: mio-inositol 55 mmol.L<sup>-1</sup>, ácido nicotínico 8 nmol.L<sup>-1</sup>, piridoxina-HCl 5 nmol.L<sup>-1</sup>, glicina 50 nmol.L<sup>-1</sup>, tiamina-HCl 6 nmol.L<sup>-1</sup>, L-glutamina 6,8 mmol.L<sup>-1</sup>, 2,4-D 2 µmol.L<sup>-1</sup>, BAP 0,5 µmol.L<sup>-1</sup>, cinetina 0,5 µmol.L<sup>-1</sup>, sacarose a 3% (m/v), caseína hidrolisada a 0,5% (m/v) e Phytigel (Sigma<sup>®</sup>) a 2% (m/v) (SANTOS *et al.*, 2002). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 com KOH antes de ser

autoclavado a 121°C (1 atm) por 20 minutos. As soluções de vitaminas, L-glutamina e de hidrolisado de caseína foram filtradas através de uma membrana esterilizante PVDF de 25 mm de diâmetro e 0,22 µm de poro e adicionadas ao meio de cultura autoclavado e frio. Para manutenção, as culturas embriogênicas foram cultivadas por 20 dias, no escuro em temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ . A cada 20 dias as culturas foram repicadas e transferidas para placas de Petri contendo o mesmo meio BM, descrito anteriormente. Para os ensaios de morfologia, viabilidade e de isolamento de mitocôndrias, as células foram utilizadas após 14 dias de cultura.

### 5.3 CONDIÇÕES DE ESTRESSE

As culturas foram submetidas ao estresse pelo frio a  $4 \pm 1^\circ\text{C}$  em sala refrigerada por 24 h ou 48 h, no escuro. As células controle foram cultivadas em estufa a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , no escuro. Como controle positivo de células inviáveis, utilizou-se células tratadas por fervura/congelamento (fervidas por 5 minutos a 100°C e congeladas em nitrogênio líquido -196°C, ciclo de 3 vezes).

### 5.4 ANÁLISES MORFOLÓGICAS

O aspecto geral das culturas foi avaliado macroscopicamente e também por microscopia óptica após coloração com carmim acético (1%) (m/v) e azul de Evans (0,5%) (m/v) de acordo com Durzan, (1988). Em uma pequena quantidade de massa celular contendo as células suspensoras e embrionárias, foram adicionadas gotas de azul de Evans (0,1%) (m/v) seguindo-se incubação de 3 min. Depois disso, o excesso de azul de Evans foi retirado e gotas de carmim acético (2%) (m/v) foram adicionadas, seguindo-se outra incubação de 3 min. Após a retirada do excesso de corante as células foram analisadas em microscópio Axiovert 40 CFL (Carl Zeiss) nos aumentos de 4x e 10x.



## 5.5 DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade celular foi determinada por três metodologias: por coloração com Azul de Evans (BAKER & MOCK, 1994; LEVINE *et al.*, 1994; BOZHKOV *et al.*, 2002), através da combinação de diacetato de fluoresceína (FDA) e iodeto de propídio (IP) (CHAVES *et al.*, 2002; MAURER *et al.*, 2010a) e, a última pela redução do MTT (CASTRO-CONCHA *et al.*, 2006; SILVA & MENÉNDEZ-YUFFÁ, 2006).

O corante Azul de Evans é preferencialmente permeante às células suspensoras (STEINER *et al.*, 2005). Neste método, alíquotas de células foram coletadas (500 mg, peso fresco) e coradas com azul de Evans 0,05% (m/v) em tampão MES 20 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 5,8, por 10 min, a 22°C. O corante que não permeou as células foi removido com o sobrenadante e o sedimento foi lavado com tampão MES por 2 vezes. Na sequência, foram adicionados 10 mL de meio de cultura seguindo-se incubação por 30 min. Após a incubação, 300 mg do material celular foi colocado em 1 mL de SDS 1% (m/v) em metanol 50% e incubado por 30 min, a 50°C. Após centrifugação (microcentrifuga da marca Vision, modelo VS-15000 CFNII) a 9.000 x g durante 5 min, a absorbância do sobrenadante foi medida a 600 nm em espectrofotômetro Shimadzu, modelo UV – 2450 UV/VIS. Os resultados foram expressos em absorbância.

O FDA, por ser apolar, entra nas células, e ao sofrer hidrólise por esterases, libera fluoresceína que permanece internalizada e emite fluorescência, visualizando-se a cor verde (JONES & SENFT, 1985; HUANG *et al.*, 1986; McCABE & LEAVER, 2000). Por outro lado, o IP que se intercala ao DNA, é capaz de permear somente células que apresentem alterações na permeabilidade de suas membranas, ou seja, as células inviáveis ou em processo de morte. O IP intercalado ao DNA emite fluorescência, visualizando-se a cor vermelha (JONES & SENFT, 1985; HUANG *et al.*, 1986). Para os ensaios de viabilidade com FDA e IP, as células foram lavadas duas vezes em tampão PBS (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mmol.L<sup>-1</sup>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8 mmol.L<sup>-1</sup>, KCl 2,7 mmol.L<sup>-1</sup>, NaCl 136,9 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,2) e coradas com IP 5 µg.mL<sup>-1</sup> e FDA 2,5 µg.mL<sup>-1</sup> em PBS, por 15 min, a temperatura ambiente. Após três lavagens sucessivas com PBS, as células foram observadas por microscopia de fluorescência. A

fluorescência do FDA e IP foi observada utilizando filtros de excitação violeta e verde, respectivamente, em microscópio Axiovert CFL 40 (Carl Zeiss).

O ensaio de MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]) baseia-se na capacidade de desidrogenases mitocondriais de reduzirem o sal de tetrazólio a formazan, apenas em células viáveis. Neste ensaio 330 mg (peso fresco) de células foram incubadas com tampão PBS na presença de MTT em concentração final de  $1,25 \text{ mmol.L}^{-1}$ , durante 8 h no escuro e a  $25^{\circ}\text{C}$ . Os sais de formazan formados foram extraídos duas vezes com  $750 \mu\text{L}$  de SDS a 1% (m/v) em 50% de metanol, seguindo-se incubação de 30 min a  $60^{\circ}\text{C}$ . Após centrifugação em microcentrifuga (marca Vision, modelo VS-15000 CFNII) a  $9000 \times g$  durante 5 min, a absorbância dos sobrenadantes foi medida em 570 nm em leitor de microplaca (modelo Epoch da Biotek). Os resultados foram expressos como % de viabilidade em relação ao controle (100%).

## 5.6 ISOLAMENTO DE MITOCÔNDRIAS

Mitocôndrias foram isoladas de 30 g de culturas de células embriogênicas de *A. angustifolia*, através de centrifugação diferencial (MARIANO *et al.*, 2004), como descrito a seguir. Culturas embriogênicas de *A. angustifolia* com 14 dias foram transferidas para um béquer na presença do meio de extração a  $4^{\circ}\text{C}$  contendo sacarose  $250 \text{ mmol.L}^{-1}$ , HEPES  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$  (pH 7,6), EGTA  $2 \text{ mmol.L}^{-1}$ , cisteína  $3 \text{ mmol.L}^{-1}$  e BSA 0,2 g% (m/v). Com o auxílio de tesoura o material foi reduzido a pequenos fragmentos. Em seguida, o tecido foi homogeneizado utilizando-se o homogeneizador van Potter–Elvehjem (10 vezes com o pistilo frouxo e 10 vezes com o pistilo apertado) e rompidas em homogeneizador Turratrec através de ciclos de 4 segundos, na presença de meio de extração a  $4^{\circ}\text{C}$ . A proporção de meio utilizado foi de 200 mL para 35 g de tecido. O homogenato foi filtrado através de tecido gabardine e o pH ajustado para 7,2 com NaOH. A seguir, este homogenato foi centrifugado (centrífuga Hitachi modelo himac CR-21E) por 10 minutos a  $1.000 \times g$  e o sobrenadante centrifugado por 10 minutos a  $15.000 \times g$ . Os precipitados resultantes foram ressuspensos em meio de isolamento (sacarose  $250 \text{ mmol.L}^{-1}$ , HEPES  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$  pH 7,2, EGTA  $0,25 \text{ mmol.L}^{-1}$ , BSA 0,2 g% (m/v)) e

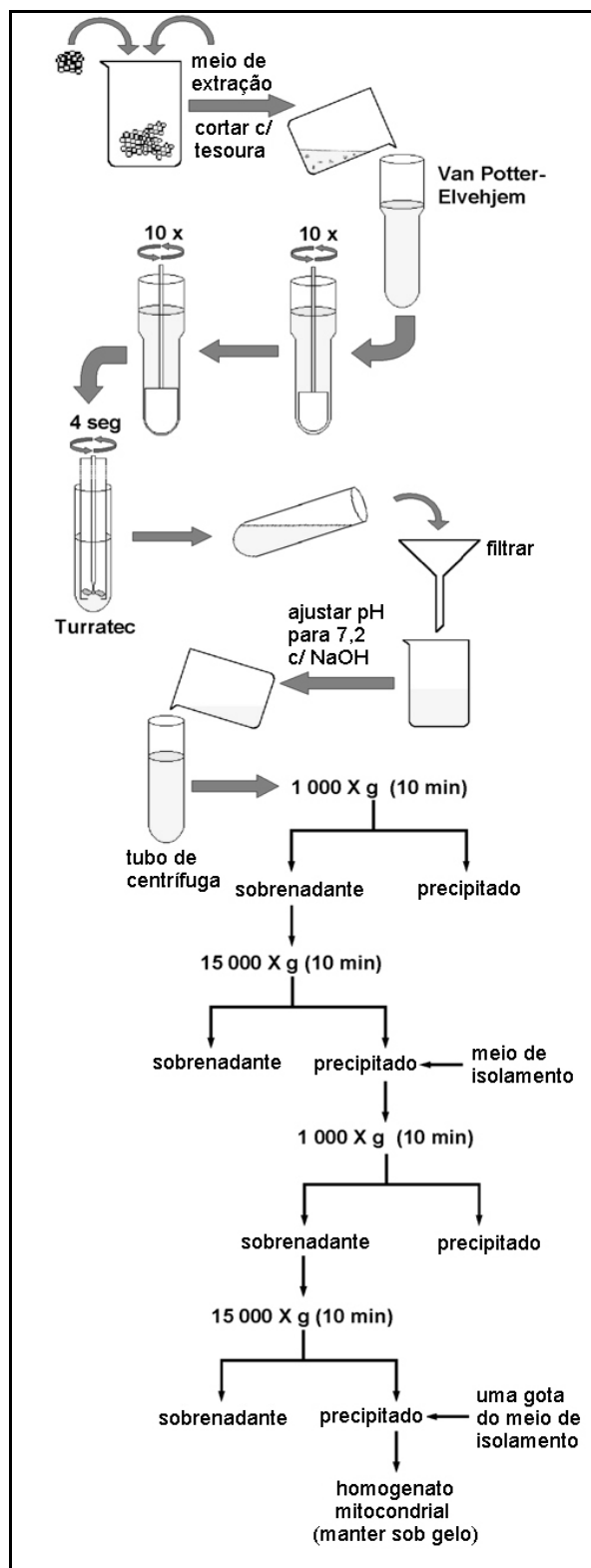
transferidos para um único tubo, seguindo-se centrifugação a 1.000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi novamente centrifugado a 15.000 x g por 10 minutos, e o precipitado, contendo a fração mitocondrial foi ressuspenso em meio de isolamento de modo a obter uma suspensão contendo aproximadamente 10–20 mg de proteína por mL. As etapas de isolamento estão representadas na Figura 9.

## 5.7 PURIFICAÇÃO DAS MITOCÔNDRIAS

A purificação da fração mitocondrial das células embriogênicas de araucária foi feito em gradiente descontínuo de Percoll<sup>®</sup>, como descrito por Jackson e colaboradores (1979) e Millar e colaboradores (2001). O extrato bruto de mitocôndrias, aproximadamente 1mL, foi depositado cuidadosamente sobre o meio de isolamento contendo sacarose 250 mmol.L<sup>-1</sup>, HEPES 10 mmol.L<sup>-1</sup> (pH 7,2), EGTA 0,25 mmol.L<sup>-1</sup>, BSA 0,2 g% (m/v) e Percoll<sup>®</sup> nas concentrações de 45%, 21% e 13% (v/v). O extrato bruto de mitocôndrias foi centrifugado em ultracentrifuga (marca Hitachi, modelo himac CP-90β) a 40.000 x g por 45 minutos e a fração mitocondrial presente logo acima do Percoll 45% foi coletada, lavada com meio de isolamento e novamente centrifugada a 15.000 x g por 15 minutos para a remoção do Percoll<sup>®</sup>. O sedimento obtido, contendo as mitocôndrias purificadas, foi ressuspenso em gotas de meio de isolamento de modo a obter uma suspensão contendo aproximadamente 10–15 mg de proteína por mL.

## 5.8 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

A concentração de proteínas das suspensões mitocondriais foi determinada pelo método descrito por Lowry e colaboradores (1951), utilizando-se BSA como padrão. As leituras foram realizadas a 700 nm em espectrofotômetro Shimadzu, modelo UV – 2450 UV/VIS.



**FIGURA 9. METODOLOGIA DE ISOLAMENTO DE MITOCÔNDRIAS DE CÉLULAS EMBRIOGÊNICAS DE *A. angustifolia***

FONTE: Mariano *et al.*, (2004).

## 5.9 DETERMINAÇÃO DO CONSUMO DE OXIGÊNIO – ATIVIDADES DA PUMP E AOX

O consumo de  $O_2$  foi determinado a  $28^\circ C$  com eletrodo de oxigênio tipo Clark (Yellow Springs Instruments Co.) em câmara fechada termostatizada em polarógrafo Gilson. O sistema de reação, em volume final de 1,3 mL, denominado meio de reação padrão, foi constituído de sacarose  $250 \text{ mmol.L}^{-1}$ , KCl  $2 \text{ mmol.L}^{-1}$ , HEPES  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$  (pH 7,2), Pi  $2 \text{ mmol.L}^{-1}$  e proteína mitocondrial em quantidade adequada para cada experimento. Este meio foi suplementado com os substratos malato de sódio  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$  e glutamato de sódio  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$  sendo realizadas outras adições de acordo com o protocolo experimental. O coeficiente de controle respiratório (CCR) foi obtido da razão entre a velocidade respiratória no estado 3 (na presença de ADP) e estado 4 (após o consumo do ADP) e foi utilizado como determinante da qualidade da preparação (CHANCE & WILLIAMS, 1955). Para a determinação do CCR, o meio de reação foi suplementado com BSA 0,2 g% (m/v),  $MgCl_2$   $5 \text{ mmol.L}^{-1}$ , EGTA  $0,1 \text{ mmol.L}^{-1}$ , malato de sódio  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$ , glutamato de sódio  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$ ,  $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$  de proteína mitocondrial e ADP  $0,2 \text{ mmol.L}^{-1}$ . Apenas preparações mitocondriais com controle respiratório acima de 2,5 foram utilizadas.

Para determinar a atividade da PUMP, o meio de reação padrão foi suplementado com oligomicina ( $2,5 \text{ } \mu\text{g.mg}^{-1}$  proteína), SHAM  $3 \text{ mmol.L}^{-1}$ , atractilosídeo  $20 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ , propranolol  $300 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ ,  $MgCl_2$   $1 \text{ mmol.L}^{-1}$ , malato de sódio  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$ , glutamato de sódio  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$  e  $0,5 \text{ mg}$  de proteína mitocondrial. Outras adições foram: ácido linoléico  $10 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ , BSA 0,1 g% (m/v), ATP  $1 \text{ mmol.L}^{-1}$  e FCCP  $1 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ .

A atividade da AOX foi determinada em um meio de reação padrão suplementado com oligomicina ( $2,5 \text{ } \mu\text{g.mg}^{-1}$  proteína), DTT  $1 \text{ mmol.L}^{-1}$ , atractilosídeo  $20 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ , propranolol  $300 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ , piruvato  $0,1 \text{ mmol.L}^{-1}$ , BSA 0,5% (m/v),  $MgCl_2$   $1 \text{ mmol.L}^{-1}$ , glutamato de sódio  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$ , malato de sódio  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$  e  $0,5 \text{ mg}$  de proteína mitocondrial. Outras adições foram: CN  $1 \text{ mmol.L}^{-1}$  e SHAM  $1 \text{ mmol.L}^{-1}$ .

As velocidades respiratórias foram expressas em nmol de oxigênio consumidos por miligrama de proteína mitocondrial por minuto, considerando-se que a solubilidade do oxigênio na água a 28°C e 1 atmosfera é de 250  $\mu\text{mol}$  por litro (ESTABROOK, 1967).

#### 5.10 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ELÉTRICO DE MEMBRANA ( $\Delta\psi$ ) – ATIVIDADE DA PUMP

O potencial elétrico de membrana foi acompanhado através da variação da fluorescência da safranina O em espectrofluorímetro Shimadzu RF-5301 PC (ÅKERMAN & WIKSTRÖM, 1976). O sistema de reação foi constituído de sacarose 250  $\text{mmol.L}^{-1}$ , HEPES 10  $\text{mmol.L}^{-1}$  (pH 7,2),  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1  $\text{mmol.L}^{-1}$ , e safranina O 5  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  em um volume final de 2 mL a 28°C. Os comprimentos de onda utilizados foram de 495 nm (excitação) e 586 nm (emissão) com abertura de fenda de 3 nm (excitação e emissão). A medida do potencial de membrana foi iniciada com os substratos malato de sódio 10  $\text{mmol.L}^{-1}$  e glutamato de sódio 10  $\text{mmol.L}^{-1}$ . Para determinação da atividade da PUMP, o meio foi suplementado com oligomicina 2,5  $\mu\text{g.mg}^{-1}$  proteína, atractilosídeo 20  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , propranolol 300  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , SHAM 3  $\text{mmol.L}^{-1}$ ,  $\text{MgCl}_2$  1  $\text{mmol.L}^{-1}$  e 0,3  $\text{mg.mL}^{-1}$  de proteína mitocondrial. Outras adições foram: ácido linoléico 10  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , BSA 0,1 g% (m/v), ATP 1  $\text{mmol.L}^{-1}$  e FCCP 1  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ . As mudanças relativas de potencial de membrana foram expressos em unidades arbitrárias de fluorescência (UA).

#### 5.11 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES

Nestes ensaios foram utilizadas preparações mitocondriais purificadas em gradiente de Percoll®.

##### 5.11.1 Catalase (CAT)

Neste ensaio, foram utilizadas mitocôndrias intactas e a atividade da catalase foi acompanhada pelo decréscimo da absorbância do  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 240 nm

(AEBI, 1984) em sistema de reação constituído de tampão fosfato 50 mmol.L<sup>-1</sup> (pH 7,0), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 mmol.L<sup>-1</sup> e 100 µg de proteína mitocondrial, em volume final de 1 mL. A atividade foi determinada a 25°C e a reação iniciada pela adição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, foi acompanhada durante 2 minutos em espectrofotômetro Shimadzu, modelo UV-2450 UV/VIS. Os resultados foram expressos em U de catalase, onde 1 U corresponde a 1 µmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> decomposto por miligrama de proteína por minuto, considerando-se o coeficiente de extinção molar de 0,394 mmol<sup>-1</sup>.L.cm<sup>-1</sup> para o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

#### 5.11.2 Superóxido dismutase (MnSOD)

Para realização destes ensaios, mitocôndrias foram rompidas por três ciclos de congelamento e descongelamento (a -196°C) e a atividade da SOD foi determinada como descrito por NISRA e FRIDOVICH (1972). O sistema de reação foi constituído de tampão carbonato 50 mmol.L<sup>-1</sup> (pH 10,2), EDTA 0,1 mmol.L<sup>-1</sup>, epinefrina 1 mmol.L<sup>-1</sup> e proteína mitocondrial em quantidade adequada em um volume final de 1 mL a 30°C. A reação foi iniciada pela adição da epinefrina e a formação do adrenocromo foi acompanhada a 480 nm durante 2 minutos em espectrofotômetro Shimadzu, modelo UV-2450 UV/VIS. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de proteína capaz de inibir em 50% a atividade da enzima. Os resultados foram expressos em relação ao controle, sendo o controle definido como 100% de atividade ou 1 unidade de SOD.

#### 5.11.3 Ascorbato peroxidase (APX)

Para realização deste ensaio, mitocôndrias foram solubilizadas em meio contendo 0,01% (v/v) de Triton X-100 para promover a permeabilização das membranas. O ensaio foi realizado em meio de reação contendo 50 mmol.L<sup>-1</sup> de tampão fosfato (pH 7,0), 0,2 mmol.L<sup>-1</sup> de ascorbato, 0,3 mmol.L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 100 µg de proteína mitocondrial. A atividade foi determinada a 25°C pelo acompanhamento da oxidação do ascorbato a 290 nm em espectrofotômetro Shimadzu, modelo UV-2450 UV/VIS (NAKANO & ASADA, 1981). Os resultados foram expressos em unidade de atividade (U) sendo 1U

correspondente a 1 nmol de ascorbato oxidado ( $\text{mg proteína} \cdot \text{min}^{-1}$ ) calculado de acordo com o coeficiente de extinção molar do ascorbato  $2,8 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

#### 5.11.4 Glutathione Redutase (GR)

A atividade da GR foi avaliada de acordo com a técnica proposta por SIES *et al.* (1979). Neste ensaio, a GR catalisa a redução da glutathione na presença de NADPH em sistema de reação constituído de tampão fosfato  $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  (pH 7,0), EDTA  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , glutathione oxidada (GSSG)  $0,66 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  e NADPH  $0,075 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ . Mitocôndrias foram permeabilizadas pela adição de deoxicolato 0,5% (m/v) e 500  $\mu\text{g}$  desta suspensão foram utilizados no sistema de reação. A reação foi mantida a  $25^\circ\text{C}$  e iniciada pela adição de GSSG. A oxidação do NADPH foi acompanhada durante 5 minutos a 340 nm em espectrofotômetro Shimadzu modelo UV-2450 UV/VIS. Os resultados foram expressos em porcentagem em relação ao controle, considerando o coeficiente de extinção molar do NADPH ( $6220 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).

#### 5.12 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE ROS

Para analisar a formação de ROS intramitocondrial foi utilizada a sonda diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) (ARMSTRONG & WHITEMAN, 2007). O DCFH-DA é capaz de se difundir para o interior das mitocôndrias, onde sofre a ação de esterases convertendo-se em diclorofluoresceína reduzida (DCFH) que, por sua vez, quando em presença de ROS é oxidada a diclorofluoresceína (DCF) emitindo fluorescência. A intensidade da fluorescência do DCF é proporcional à quantidade de ROS intracelular (CHEN *et al.*, 2010). As mitocôndrias foram incubadas no escuro com PBS pH 7,4, rotenona  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  e DCFH-DA  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ . A reação foi iniciada com a adição de succinato  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  (ESPOSTI, 2002; MAXWELL *et al.*, 1999). A intensidade da fluorescência foi monitorada em leitor de microplacas (TECAN-Infinite M200) usando os comprimentos de onda de 485 nm (excitação) e 530 nm (emissão). Os resultados foram expressos em porcentagem em relação ao controle.



### 5.13 DETERMINAÇÃO DA LIPOPEROXIDAÇÃO MITOCONDRIAL

A peroxidação de lipídios em mitocôndrias foi avaliada através do método que identifica espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (HODGES *et al.*, 1999). Esta reação foi monitorada a 535 nm em espectrofotômetro Shimadzu, modelo UV-2450 UV/VIS.

As mitocôndrias, obtidas como descrito no item 5.6, foram incubadas sob agitação, a 37°C, em meio de reação constituído de: D-manitol 250 mmol.L<sup>-1</sup>, HEPES 10 mmol.L<sup>-1</sup> (pH 7,2) e os indutores (ADP, FeCl<sub>3</sub> em presença de 2-oxoglutarato) (TAKAYANAGI *et al.*, 1980). Alíquotas foram retiradas nos tempos 0, 10, 20, 30 e 45 minutos e acrescidos de 2 mL de reativo constituído de ácido tricloroacético (TCA) 15% (m/v), ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,4% (m/v) em HCl 0,25 N e solução etanólica de butil hidroxitoluênto (BHT) 0,01% (m/v). A mistura foi submetida à fervura por 15 minutos em banho-maria, resfriada e centrifugada (centrífuga Hitachi, modelo himac CR-21E) a 12.000 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi submetido à leitura em 535 nm e os resultados expressos em % do controle. Para calcular a quantidade de TBARS (nmol por miligrama de proteína mitocondrial), utilizou-se o coeficiente de extinção molar do aduto malondialdeído-TBA de  $1,56 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$  (BUEGE & AUST, 1978).

### 5.14 SEQUENCIAMENTO DO GENE DA *aox*

#### 5.14.1 Extração de DNA das células embriogênicas de *A. Angustifolia*

O sequenciamento do gene da AOX foi realizado no estágio sanduíche – PDEE (CAPES) no Laboratório de Biologia Molecular (ICAAM) – EU Marie Curie Chair na Universidade de Évora - Portugal, sob a orientação da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Birgit Arnholdt-Schmitt.

As células embriogênicas de *A. angustifolia* foram cultivadas por 14 dias no escuro em temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ . O DNA genômico foi então extraído destas células utilizando o kit DNeasy (Qiagen, Hilden, Alemanha), seguindo-se as instruções do fabricante. Para a obtenção de DNA de boa qualidade as células embriogênicas de araucária foram trituradas com nitrogênio líquido e

submetidas à liofilização. O DNA obtido foi analisado em gel de agarose 1,4% (m/v) após coloração com brometo de etídio.

#### 5.14.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Fragmentos dos genes da *aox* foram identificados e amplificados usando duas combinações diferentes de *primers* degenerados. Os *primers* foram localizados na porção conservada do éxon 3 de acordo com as estruturas de éxons/introns do gene *aox1a* da *A. thaliana*. (SAISHO *et al.*, 1997). Os *primers* utilizados, foram os P1 e P2 (SAISHO *et al.*, 1997) e 42AOXF e 45AOXR (FREDERICO *et al.*, 2009a) (Figura 10), apresentados na Tabela 1. A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada com Pure-To-Go PCR Beads (GE Healthcare, Little Chalfont, Inglaterra) utilizando 10 ng de DNA como *template*. Os ciclos do PCR foram otimizados em 35 ciclos de amplificação, cada um constituído por 30 segundos a 94°C para desnaturação, 1 min a 60°C ou 55°C para anelamento (dependendo dos *primers*), e 1 min a 72°C para alongamento. Depois do último ciclo, foi realizada mais uma etapa de alongamento a 72°C por 10 min. Os fragmentos de PCR foram analisados em gel de agarose 1,4% (m/v) após coloração com brometo de etídio.

<b>Primers</b>	<b>Sequência</b>
P1	5'-CTGTAGCAGCAGT(AGC)CCTGG(AGC)ATGGT-3'
P2	5'-GGTTTACATC(AG)CG(AG)TG(AG)TG(AT)GCCTC-3'
42AOXF	5'-GCDGCDGTBCCDGGVATGGT-3'
45AOXR	5'-TCVCKRTGRTGHGCTCRCTC-3'

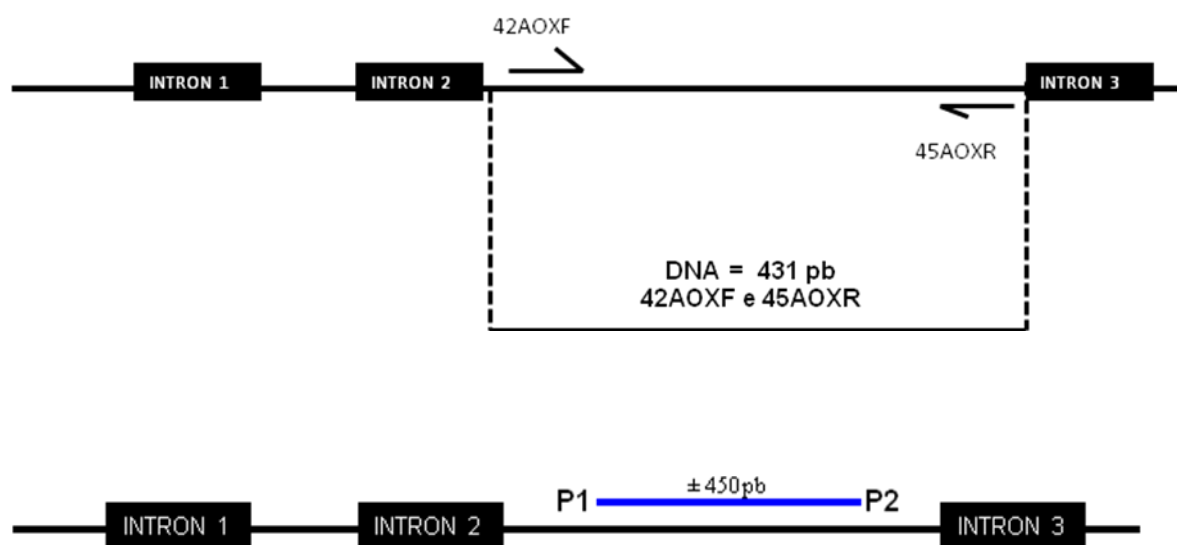
**TABELA 1. SEQUÊNCIA DOS PRIMERS DA AOX UTILIZADOS NA AMPLIFICAÇÃO POR PCR**

FONTE: O autor (2012).

#### 5.14.3 Reações de clonagem

Os fragmentos gerados por PCR foram purificados usando o kit Zymoclean gel DNA Recovery da Zymo Research e clonados em pGEM®-T

Easy Vector System I (Promega, Madison, WI, EUA) (Figura 11). O produto foi usado para transformar células competentes de *Escherichia coli* JM109 (Promega, Madison WI, EUA). O DNA plasmidial de clones de bactérias recombinantes foi extraído segundo o protocolo de lise alcalina (BIRNBOIM & DOLY, 1979). Diferentes clones foram caracterizados usando as enzimas de restrição EcoRI, HpyF3I e AluI (Fermentas, Ontário, Canadá).



**FIGURA 10. DIFERENTES PRIMERS DESENHADOS PARA O GENE *aox***

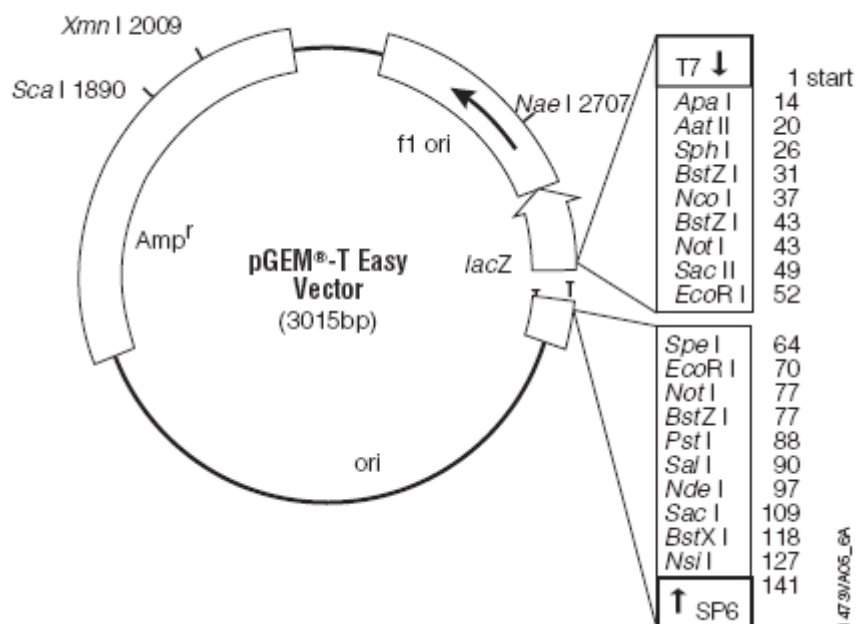
FONTE: O autor (2012).

NOTA: Esquema representativo dos tamanhos esperados dos produtos de PCR e RT-PCR utilizando os diferentes *primers* desenhados para o gene *aox*.

#### 5.14.4 Análise da sequência

Os clones selecionados foram sequenciados de ambas as extremidades utilizando primers específicos (T7 e SP6) para o vetor. Buscas de sequências homólogas foram realizadas utilizando o banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information) e realizadas através dos algoritmos *blastb* e *blastp* (ALTSCHUL *et al.*, 1990). Para o alinhamento entre as sequências obtidas no presente trabalho e sequências homólogas retiradas do banco de dados utilizou-se o método ClustalW do programa BioEdit. Clones bacterianos com elevada homologia com as sequências da AOX de plantas de banco de dados foram traduzidas em proteínas utilizando o software

EditSeq do pacote de bioinformática Lasergene 7 (Dnastar Inc., Madison, WI, EUA). O programa MEGA 3.1 foi utilizado para construção da árvore filogenética.



**FIGURA 11. MAPA DO VETOR pGEM®-T EASY**

FONTE: Retirado do manual do kit da Promega.

### 5.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados dos experimentos realizados com as preparações mitocodriais foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão (média  $\pm$  dp) e submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey para a comparação. Foram considerados estatisticamente significativos os valores comparados ao nível de significância  $p < 0,05$ .

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 MORFOLOGIA DAS CÉLULAS EMBRIOGÊNICAS DE *A. angustifolia*

O aspecto macroscópico das células embriogênicas de *A. angustifolia* cultivadas em meio semi-sólido, pode ser observado na Figura 12 A. Como descrito para estas culturas (ASTARITA & GUERRA, 1998; SANTOS *et al.*, 2002; SILVEIRA *et al.*, 2002; STEINER *et al.*, 2005), as células apresentaram-se como agregados branco-translúcidos, aspecto associado com a competência para o desenvolvimento celular (GUERRA *et al.*, 2000; SANTOS *et al.*, 2002 e 2010). Segundo alguns autores, o aspecto branco-translúcido serve como um controle de qualidade destas culturas e, por outro lado, a presença de aglomerados celulares de cor marrom está associada com a redução da capacidade proliferativa (GUERRA *et al.*, 2000; SANTOS *et al.*, 2002 e 2010).

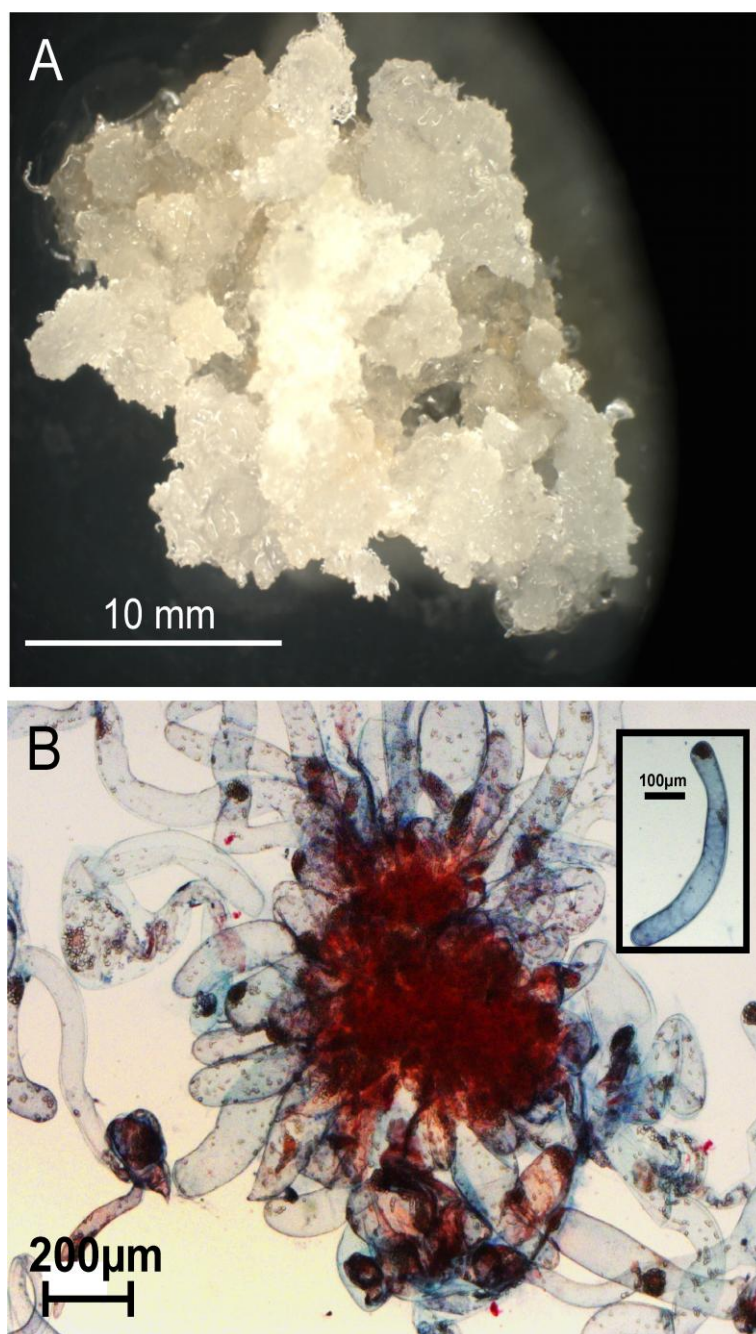
As análises microscópicas mostraram dois principais tipos celulares nestas culturas (Figura 12 B), as células embrionárias e as suspensoras. As primeiras são reativas ao carmim acético e, portanto, coradas em vermelho, são pequenas e com citoplasma denso. Já as células suspensoras são alongadas e apresentam-se coradas em azul por serem permeáveis ao corante azul de Evans. Durante a multiplicação, as células apresentam-se como agregados (STEINER *et al.*, 2005; SILVEIRA *et al.*, 2006), sendo as embrionárias associadas com a competência para o desenvolvimento celular (ASTARITA & GUERRA, 2000; STEINER *et al.*, 2005; SANTOS *et al.*, 2010). O aspecto microscópico, tanto das células embrionárias como das suspensoras, está de acordo com o descrito na literatura (ASTARITA & GUERRA, 1998; ASTARITA & GUERRA, 2000; SANTOS *et al.*, 2002; STEINER *et al.*, 2005; SILVEIRA *et al.*, 2006).

Sabe-se que alterações na morfologia destas células estão associadas com a morte celular (MAURER *et al.*, 2010a) e também podem ocorrer devido a variações na composição dos meios de cultura, como a fonte de carbono (STEINER *et al.*, 2005) e a presença de fitorreguladores (SANTOS *et al.*, 2010).

Células submetidas ao estresse pelo frio de 24h e 48h a 4°C também foram analisadas por microscopia óptica e apresentaram aspectos morfológicos pela coloração com azul de Evans e carmim acético semelhante ao grupo controle (dados não mostrados).

## 6.2 EFEITO DO ESTRESSE PELO FRIO SOBRE A VIABILIDADE DAS CÉLULAS EMBRIOGÊNICAS DE *A. angustifolia*

A determinação da viabilidade celular é essencial para o monitoramento das culturas celulares, pois, pode ser um indicativo do potencial proliferativo destas e, ainda, evita a inclusão de células mortas nos experimentos. No entanto, para as células embriogênicas de *A. angustifolia*, os ensaios de determinação da viabilidade celular que utilizam métodos de contagem celular são dificultados devidos à presença de agregados, inviabilizando a determinação quantitativa confiável deste parâmetro. Esta limitação foi descrita também para outras culturas como da “Norway spruce” (*Picea abies* L. Karst) (BOZHKOV *et al.*, 2002). Devido a este fato, na maioria das vezes, opta-se por métodos espectrofotométricos para avaliação da viabilidade celular. Neste estudo, foram utilizados três métodos para avaliar a viabilidade das células controle e das células submetidas ao estresse pelo frio (24 h e 48 h a 4°C): o corante azul de Evans (BAKER & MOCK, 1994; LEVINE *et al.*, 1994; BOZHKOV *et al.*, 2002), a combinação de FDA (diacetato de fluoresceína) e IP (iodeto de propídio) (CHAVES *et al.*, 2002; MAURER *et al.*, 2010a) e a redução do MTT (CASTRO-CONCHA *et al.*, 2006; SILVA & MENÉNDEZ-YUFFÁ, 2006).



**FIGURA 12. MORFOLOGIA DAS CÉLULAS EMBRIOGÊNICAS DE *A. angustifolia***

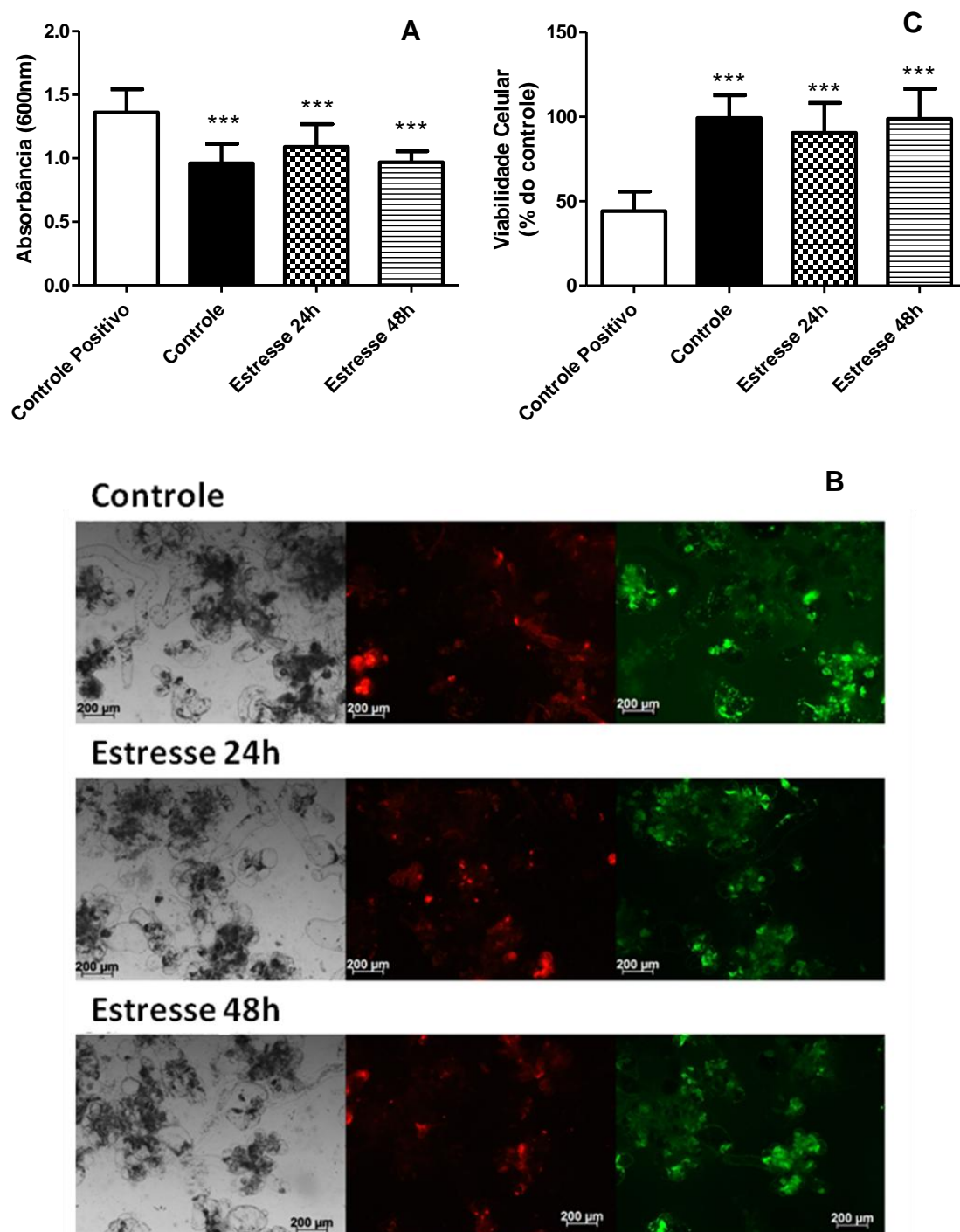
FONTE: O autor (2012).

NOTA: **A.** Aspecto macroscópico das culturas de células embriogênicas de *A. angustifolia* crescidas em meio de cultura semi-sólido a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  (células controle). **B.** Aspecto microscópico das células controle de *A. angustifolia* (14 dias), usando coloração dupla com azul de Evans e carmim acético. Em vermelho: células embrionárias reativas ao carmim acético. Em azul: células suspensoras permeáveis ao corante azul de Evans (uma célula suspensora isolada é mostrada no inserto). As condições experimentais estão descritas no item 5.4 de Materiais e Métodos. As imagens são representativas de três experimentos independentes.

Na Figura 13 A, podemos observar os resultados dos experimentos de viabilidade utilizando o corante azul de Evans, que é naturalmente permeante às células suspensoras viáveis (Figura 12 B). No entanto, este corante permeia apenas células embrionárias inviáveis. Assim, este método avalia somente a viabilidade destas últimas. Como controle positivo de células inviáveis, utilizou-se células tratadas por fervura/congelamento (fervidas por 5 minutos a 100°C e congeladas em nitrogênio líquido -196°C, ciclo de 3 vezes). Observa-se na Figura 13 A que o estresse pelo frio não alterou a viabilidade das células embrionárias, quando comparadas ao controle (sem estresse). Ainda na mesma figura, a pequena diferença observada entre as absorbâncias entre grupos controle (células cultivadas a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ) e controle positivo ocorre devido à permeabilidade natural das células suspensoras viáveis ao corante, como mencionado anteriormente. Esta permeabilidade natural das células suspensoras também foi descrita para outras espécies, como “*Norway spruce*” (*Picea abies* L. Karst) (FILONOVA *et al.*, 2000a,b).

Embora os resultados da viabilidade utilizando o corante azul de Evans sugiram o não comprometimento da viabilidade destas células pelo estresse pelo frio, o fato de avaliar apenas as células embrionárias, torna este método limitado. Portanto, para confirmar este resultado e, ainda, para evitar erros de interpretação, a viabilidade de ambos os tipos celulares presentes nas culturas foi determinada utilizando a sonda fluorescente FDA em combinação com IP. A característica apolar do FDA permite sua entrada nas células viáveis e sua hidrólise por esterases endógenas libera a fluoresceína, que fica retida no interior das células, emitindo fluorescência de cor verde (EDIDIN, 1970; JONES & SENFT, 1985; HUANG *et al.*, 1986; McCABE & LEAVER, 2000). Em contraste, o IP é permeável apenas às células que apresentam danos em sua membrana, como células mortas ou que estão em vias de morte, intercalando-se com o DNA e emitindo um sinal de fluorescência vermelha (EDIDIN, 1970; JONES & SENFT, 1985; HUANG *et al.*, 1986). A Figura 13 B mostra que não houve diferença significativa entre o controle e as células estressadas (24 h ou 48 h), para ambas as sondas, uma vez que as cores verde e vermelho, que identificam as células viáveis e não viáveis, respectivamente, estão igualmente distribuídas em todas as imagens.





**FIGURA 13. EFEITO DO ESTRESSE PELO FRIO SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS EMBRIOGÊNICAS DE *A. angustifolia***

FONTE: O autor (2012).

NOTA: **A.** Viabilidade celular avaliada pelo corante azul de Evans 0,05% (m/v). **B.** Viabilidade celular avaliada com a FDA e IP. Painéis, da esquerda para a direita: microscopia de contraste de fase, microscopia de fluorescência para FDA e IP, utilizando os filtros de excitação verde e vermelho, respectivamente. **C.** Viabilidade celular avaliada por MTT. Controle positivo: células submetidas a ciclos de fervura/congelamento; controle: células sem estresse ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ); estresse pelo frio ( $4 \pm 1^\circ\text{C}$ ) por 24 h e 48 h, respectivamente. As condições experimentais são descritas no item 5.5 de Materiais e Métodos. Em **A** e **C** os valores correspondem a média  $\pm$  dp de 3 experimentos independentes em quadruplicatas. Valores significativamente diferentes do controle positivo \*\*\* $p < 0,001$ .

Embora os resultados dos ensaios de viabilidade utilizando FDA e IP estejam de acordo com os ensaios com azul de Evans, sugerindo que o estresse pelo frio não foi capaz de diminuir a viabilidade celular, foram também realizados ensaios com MTT, com o objetivo de verificar a viabilidade celular por outro método quantitativo de células metabolicamente viáveis. Neste ensaio, o MTT é reduzido a formazan por desidrogenases mitocondriais apenas em células viáveis, com mitocôndrias funcionais (SILVA & MENÉNDEZ-YUFFÁ, 2006; TISSERAT & MANTHEY, 1996). Células rompidas por um tratamento de fervura/congelamento, como descrito no ensaio com azul de Evans, foram utilizadas como controle positivo de morte celular. A Figura 13 C também mostra que o estresse pelo frio não promoveu alterações significativas na viabilidade celular, quando comparado com o grupo controle (sem estresse).

Desta forma, três diferentes métodos garantiram que a exposição da cultura de células embriogênicas a baixas temperaturas (4°C por 24 h ou 48 h) não alterou a viabilidade destas células. Estes resultados asseguraram que os possíveis efeitos em mitocôndrias isoladas não seriam consequência do comprometimento, ou mesmo da morte celular.

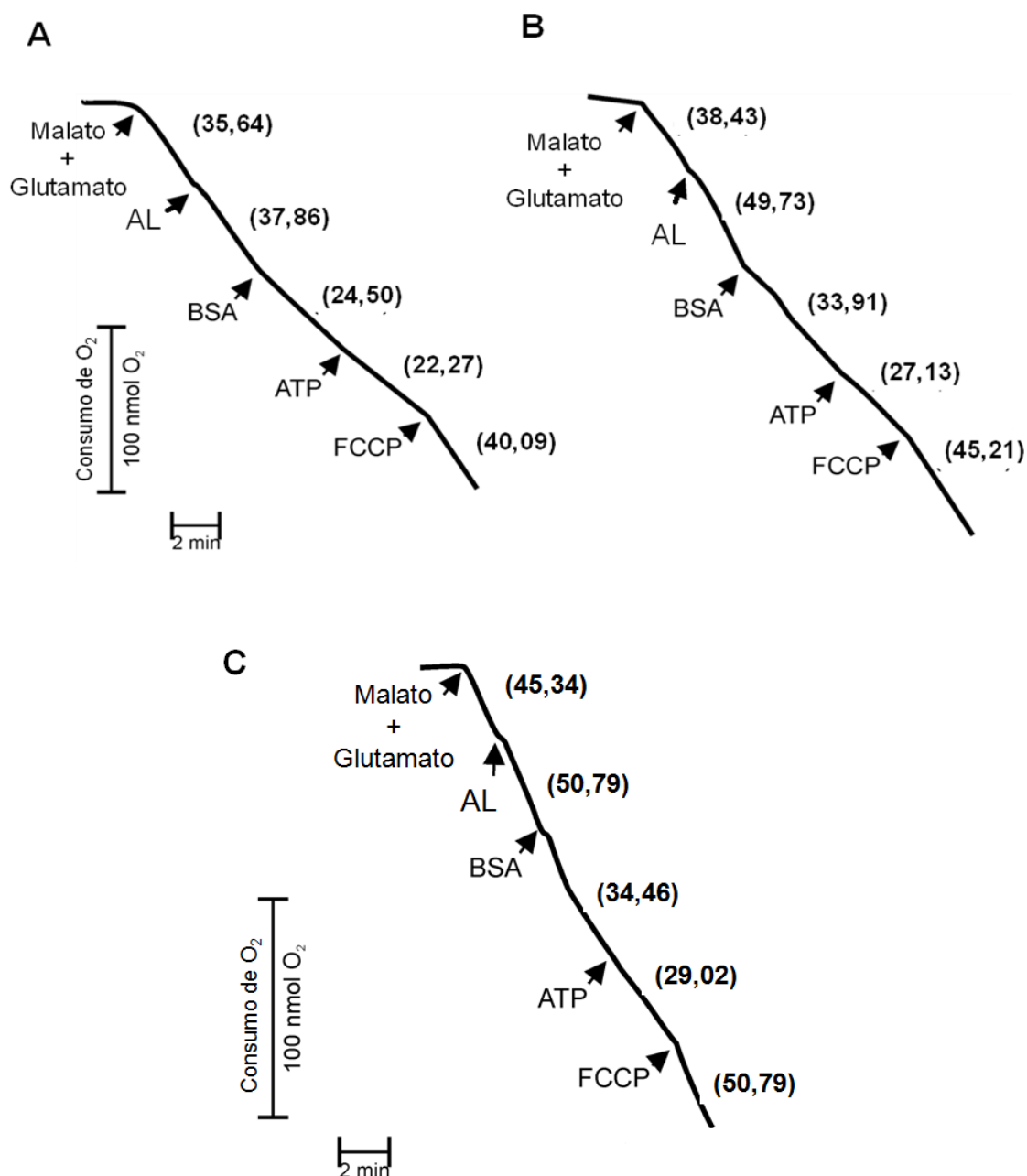
### 6.3 EFEITO DO ESTRESSE PELO FRIO SOBRE A ATIVIDADE DA PUMP E DA AOX

A PUMP é uma proteína integral de membrana que dissipa o gradiente eletroquímico de prótons impedindo, assim, a síntese de ATP (VERCESI *et al.*, 1995; LALOI *et al.*, 1997). É ativada por AG livres como o AL e é inibida por BSA e nucleotídeos de adenina ou guanina como o ATP, ADP, GTP e GDP (VERCESI *et al.*, 2006).

Na Figura 14 são mostrados traçados demonstrativos nos quais a atividade da PUMP de mitocôndrias de células de *A. angustifolia*, submetidas ou não ao estresse pelo frio, foi estimada pelo consumo de oxigênio. O traçado A corresponde ao experimento controle (células não submetidas ao estresse) e os traçados B e C aos realizados com mitocôndrias isoladas de células submetidas a  $4 \pm 1^\circ\text{C}$  por, 24 h e 48 h, respectivamente. Nestes experimentos

o meio de reação foi suplementado com propranolol para inibir o canal aniônico de plantas, SHAM para inibir a AOX, atractilosídeo que inibe o translocador ATP/ADP e oligomicina que inibe a ATPsintase (BEAVIS & VERCESI, 1992; VANLERBERGHE & McINTOSH, 1992; MARTINS *et al.*, 1993; MILLAR *et al.*, 1996).

Observa-se que a adição de AL, um reconhecido estimulador da UCP em animais e plantas (NANTES *et al.*, 1999; PASTORE *et al.*, 2000; VERCESI *et al.*, 2006), promove um aumento da respiração mitocondrial, tanto no controle como na situação de estresse pelo frio (Figura 14 A-C). O consumo de oxigênio foi inibido, em ambos os casos, pela adição de BSA e ATP, conhecidos inibidores da PUMP (VERCESI *et al.*, 2006). Além disso, a adição do protonóforo FCCP promoveu um aumento da velocidade do consumo de oxigênio, como esperado (Figura 14 A). A atividade da PUMP foi estimada através da diferença entre as velocidades do consumo de oxigênio após seu estímulo por AL e, após sua inibição, pela adição de BSA mais ATP, segundo Calegario e colaboradores (2003), como descrito a seguir. Para o controle (Figura 14 A), a velocidade de consumo de oxigênio após a adição de AL foi de  $37,86 \text{ nmol de oxigênio min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$  de proteína (inclinação 2) e, após a adição de BSA e ATP, foi de  $22,27 \text{ nmol de oxigênio min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$  de proteína (inclinação 4). A atividade da PUMP correspondente a  $15,59 \text{ nmol de oxigênio consumido min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$  de proteína, foi calculada pela subtração dos valores correspondentes a inclinação 2 dos valores da inclinação 4 e, foi considerada como 100% de atividade da proteína. O mesmo cálculo foi realizado para mitocôndrias isoladas de células submetidas ao estresse pelo frio por 24 h (Figura 14 B). Do consumo de oxigênio correspondente à adição do AL ( $49,73 \text{ nmol de oxigênio min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$  de proteína - inclinação 2) foi subtraído o valor correspondente após a inibição da PUMP pela adição de BSA e ATP ( $27,13 \text{ nmol de oxigênio min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$  de proteína). Assim, a atividade de PUMP foi de  $22,6 \text{ nmol de oxigênio consumido por minuto por miligrama de proteína}$ , o que representa um aumento de ~45% na atividade desta proteína nas condições de estresse pelo frio ( $4^{\circ}\text{C}$  por 24 h) em relação ao controle.



**FIGURA 14. EFEITO DO ESTRESSE PELO FRIO SOBRE A ATIVIDADE DA PUMP – ENSAIOS DE CONSUMO DE OXIGÊNIO**

FONTE: O autor (2012).

NOTA: **A.** Controle sem estresse ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ). **B e C.** Estresse pelo frio ( $4 \pm 1^\circ\text{C}$ ) por 24 h e 48 h, respectivamente. A suspensão mitocondrial ( $0.5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) foi adicionada ao meio de reação padrão (item 5.9 de Materiais e Métodos), sem BSA, suplementado com oligomicina  $2,5 \mu\text{g.mg}^{-1}$  de proteína, atractilósídeo  $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , propranolol  $300 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , SHAM  $3 \text{ mmol.L}^{-1}$  e  $\text{MgCl}_2$   $1 \text{ mmol.L}^{-1}$ . A reação foi iniciada pela adição dos substratos malato  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$  e glutamato  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$ . Outras adições foram: ácido linoleico (AL)  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , BSA  $0,1 \text{ g\%}$  (m/v), ATP  $1 \text{ mmol.L}^{-1}$  e FCCP  $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , como indicado na figura. A figura é representativa de 4 experimentos independentes realizados em triplicatas. O número entre parênteses corresponde as velocidades de consumo de oxigênio expressas em  $\text{nmol O}_2.\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$  de proteína mitocondrial.

Estes cálculos também foram realizados para os experimentos correspondentes ao estresse pelo frio de 48 h (Figura 14 C), e a atividade da PUMP aumentou em ~40% quando comparada as mitocôndrias obtidas das células controle.

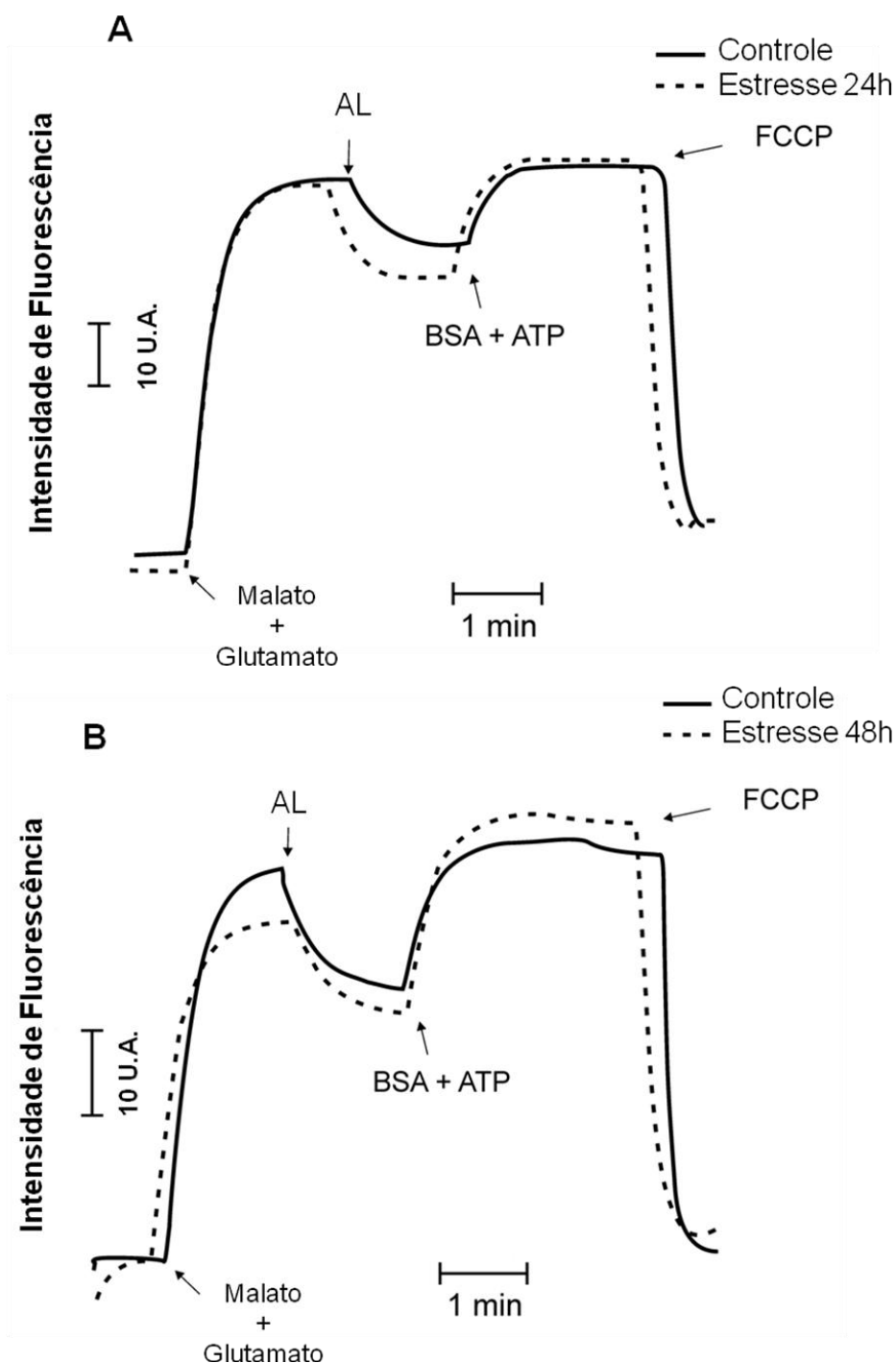
Nos resultados apresentados na Figura 14, chama a atenção o fato de que, embora o AL tenha sido capaz de ativar a PUMP, a velocidade do consumo de oxigênio após a adição do AG foi menor em comparação a descrita anteriormente por Mariano e colaboradores (2008), em células não submetidas ao estresse e nas mesmas condições experimentais. Além disso, observou-se que mitocôndrias isoladas na presença ou ausência de BSA, apresentavam níveis similares de atividade da PUMP, na ausência de AL (dados não mostrados), para células submetidas ou não ao estresse pelo frio. Estas observações sugerem que a PUMP já estaria ativada, em certo grau, nas células não submetidas ao estresse (controle). Esta ativação estaria associada ao tempo de manutenção das culturas, necessário para a conclusão dos experimentos, que foi de aproximadamente um ano. Esta observação deverá ser levada em consideração em estudos posteriores utilizando este modelo experimental. Ainda neste contexto, Nantes e colaboradores (1999) mostraram que a PUMP, em mitocôndrias de tubérculo de batata, é induzida pelo envelhecimento a 28°C durante 7 dias, e que esta indução foi ainda mais estimulada quando os tubérculos foram armazenados a baixas temperaturas (4°C) durante o mesmo período de tempo.

A atividade da PUMP também foi determinada através da medida do potencial elétrico de membrana ( $\Delta\psi$ ), utilizando safranina O, nas mesmas condições experimentais descritas para os ensaios de consumo de oxigênio. Em mitocôndrias não energizadas, a safranina, que possui carga positiva, distribui-se nos dois lados da membrana mitocondrial interna. Com a formação do potencial de membrana, este corante desloca-se preferencialmente do espaço intermembranas para a matriz mitocondrial, interagindo com os sítios aniônicos, formando paliçadas. Este fenômeno pode ser acompanhado pela alteração da fluorescência da safranina O, permitindo estabelecer uma relação entre o valor de  $\Delta\psi$ , resultante da energização da organela, e a variação da

fluorescência, resultante da ligação das moléculas de safranina no interior da mitocôndria (ÅKERMAN & WIKSTRÖM, 1976).

Os experimentos de consumo de oxigênio (Figura 14) demonstram a ativação da PUMP após a adição de AL. Esta ativação pode comprometer a formação e/ou manutenção do  $\Delta\psi$ . A Figura 15 mostra a formação do potencial de membrana ( $\Delta\psi$ ) a partir de mitocôndrias energizadas com malato/glutamato. Nestes experimentos, a adição de AL promoveu uma diminuição do potencial de membrana nas mitocôndrias de células submetidas ou não ao estresse. No entanto, este efeito foi maior em mitocôndrias de células submetidas ao estresse pelo frio de 24 h em relação à 48 h, quando comparados aos respectivos controles. Nos ensaios de consumo de oxigênio (Figura 14), a inibição adicional da PUMP por ATP (adicionado após BSA) foi de aproximadamente 6% e 12% para as condições controle e estresse, respectivamente. Esta discreta inibição da proteína por ATP não foi observada nos ensaios de potencial de membrana, quando as adições de BSA e ATP foram realizadas de forma independente (dados não mostrados). Assim, estes inibidores foram adicionados simultaneamente. Como visto na Figura 15 A, os inibidores da PUMP restauraram o  $\Delta\psi$  da mitocôndria de células estressadas pelo frio por 24 h a valores iguais aos das células controle.

Em mitocôndrias de células sujeitas ao estresse pelo frio durante 48 h, o  $\Delta\psi$  inicial (após a adição de substrato oxidável) foi menor em comparação ao controle (Figura 15 B). No entanto, o potencial de membrana foi restaurado para um nível mais elevado após a adição de BSA e ATP nestas mitocôndrias, em comparação com o controle. Estes resultados indicam que a PUMP já estava parcialmente ativada nestas preparações mesmo antes da adição de AL. A adição de FCCP, um desacoplador clássico da fosforilação oxidativa, causou o colapso do potencial de membrana, o que era esperado (Figura 15).



**FIGURA 15. EFEITO DO ESTRESSE PELO FRIO SOBRE A ATIVIDADE DA PUMP – ENSAIOS DE POTENCIAL DE MEMBRANA ( $\Delta\psi$ )**

FONTE: O autor (2012).

NOTA: **A.** Mitocôndrias submetidas ao estresse pelo frio 24 h ( $4 \pm 1^\circ\text{C}$ ) e seu respectivo controle ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ). **B.** Mitocôndrias submetidas ao estresse de 48 h ( $4 \pm 1^\circ\text{C}$ ) e seu respectivo controle ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ). A suspensão mitocondrial ( $0.3 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) foi adicionada ao meio de reação padrão (item 5.10 de Materiais e Métodos), sem BSA e suplementado com oligomicina  $2,5 \mu\text{g.mg}^{-1}$  de proteína, atractilósídeo  $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , propranolol  $300 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , SHAM  $3 \text{ mmol.L}^{-1}$  e  $\text{MgCl}_2$   $1 \text{ mmol.L}^{-1}$ . A reação foi iniciada pela adição dos substratos malato  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$  e glutamato  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$ . Outras adições foram: ácido linoleico (AL)  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , BSA  $0,1 \text{ g\%}$  (m/v), ATP  $1 \text{ mmol.L}^{-1}$  e FCCP  $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$  como indicado na figura. A figura é representativa de 4 experimentos independentes realizados em triplicatas.

Com base nos resultados dos experimentos de consumo de oxigênio e do potencial de membrana é possível sugerir que o estresse pelo frio promove um aumento da atividade da PUMP. Esta resposta é descrita para outras espécies submetidas a baixas temperaturas e pode estar relacionada ao mecanismo de defesa destas plantas a este tipo de estresse (NANTES *et al.*, 1999; CALEGARIO *et al.*, 2003; PINHEIRO *et al.*, 2004). Neste sentido, Calegario e colaboradores (2003) mostraram o aumento na expressão e atividade PUMP em mitocôndrias de tubérculos de batata (*Solanum tuberosum*, L. var. Bintje) submetidos ao estresse pelo frio ( $5 \pm 1^\circ\text{C}$ ), porém, o tempo de estresse foi maior, de 10 dias.

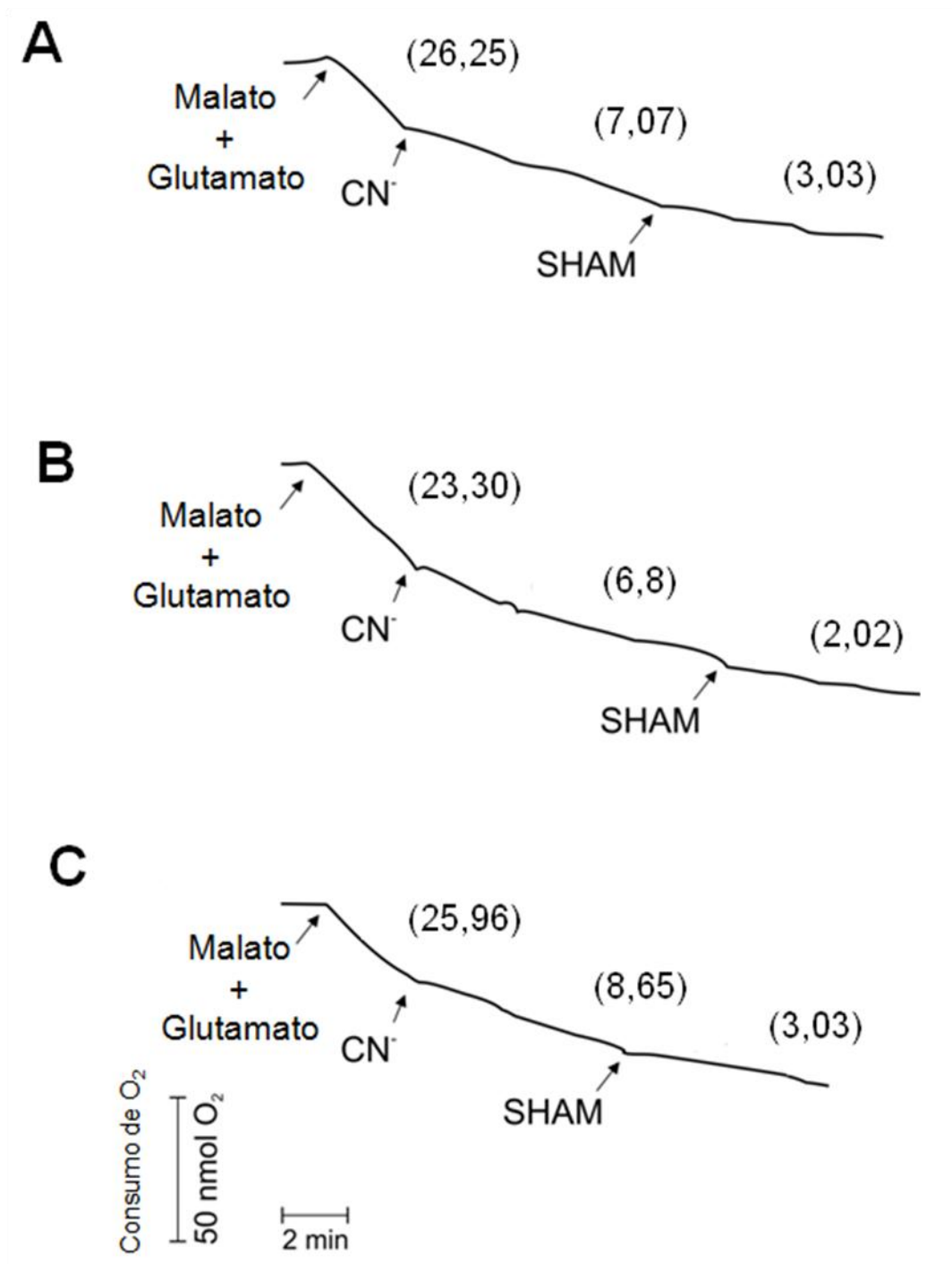
Ainda, no presente estudo, a maior atividade da PUMP sob condições de estresse pelo frio é compatível com o aumento de sua expressão, descrita por Valente e colaboradores (2012). Os autores, avaliaram a expressão da proteína nas mesmas condições experimentais, utilizando anticorpo primário de *Arabidopsis thaliana* (*AtPUMP*) e demonstraram um aumento da expressão da proteína em ~40% e ~150% para o estresse de 24 h e 48 h, respectivamente. Destaca-se o fato de que a maior expressão da PUMP tenha ocorrido em 48 h, mas aumentos em sua atividade foram muito similares nos tempos de estresse de 24 h e 48 h (Figuras 14 e 15). Para interpretar estes resultados é importante considerar que além da PUMP, a planta dispõe de outros mecanismos de defesa em resposta ao estresse, particularmente se este induz a um desequilíbrio no estado redox celular, frequentemente associado à exposição a baixas temperaturas (KUK *et al.*, 2003; PINHEIRO *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2011). Neste caso, podem ocorrer alterações também na atividade/expressão da AOX e/ou das enzimas antioxidantes. Alterações nas atividades destas proteínas serão abordadas a seguir.

Mariano e colaboradores (2008) e Valente (2007) demonstraram a presença da AOX em mitocôndrias isoladas de *A. angustifolia* em experimentos de consumo de  $\text{O}_2$  utilizando succinato, NADH e malato/glutamato como substratos oxidáveis. No presente estudo, a atividade da AOX foi avaliada em mitocôndrias isoladas de células submetidas ao estresse pelo frio no intuito de evidenciar um possível aumento da atividade desta enzima, que tem sido relacionada com a proteção contra ROS (PURVIS, 1997; MAXWELL *et al.*, 1999; MØLLER, 2001).



A Figura 16 mostra traçados demonstrativos de consumo de oxigênio, no qual a atividade da AOX foi determinada em mitocôndrias de *A. angustifolia* submetidas ao estresse pelo frio durante 24 h e 48 h a 4°C, utilizando malato e glutamato como substratos oxidáveis. Para promover a atividade enzimática máxima, o meio de reação foi suplementado com os seguintes aditivos: propranolol (inibidor do canal aniônico de plantas), DTT e piruvato (estimuladores da AOX), atractilosídeo (inibidor do translocador ADP/ATP), oligomicina (inibidor da ATPsintase), e ATP e BSA (inibidores da PUMP) (BEAVIS & VERCESI, 1992; MARTINS *et al.*, 1993; WAGNER *et al.*, 1995; VERCESI *et al.*, 2006). Observa-se que a adição de cianeto (CN) inibiu a respiração mediada pelos complexos III e IV, permanecendo somente o consumo de oxigênio decorrente da atividade da AOX (Figura 16). Este consumo foi quase completamente inibido pela adição de SHAM, um inibidor da enzima (VANLERBERGHE & McINTOSH, 1992; MILLAR *et al.*, 1996). Em mitocôndrias obtidas de células não submetidas ao estresse, a atividade da AOX foi similar a de mitocôndrias de células submetidas ao estresse, em torno de ~30% da respiração total.

Os resultados deste estudo mostram o aumento da atividade da PUMP em resposta ao estresse pelo frio, enquanto uma estimulação significativa da AOX não foi observada. Diferentemente, Calegario e colaboradores (2003) mostraram que mitocôndrias de tubérculos de batata (*Solanum tuberosum*, L. var. Bintje) submetidos ao estresse pelo frio por um período mais longo ( $5 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 10 dias) exibem um aumento da expressão e da atividade da PUMP, bem como a ativação da AOX. A atividade diferencial destas proteínas pode ser associada com as fases de desenvolvimento da planta. Por exemplo, em mitocôndrias de tomate verde (*Lycopersicon esculentum*) a atividade da AOX diminuiu durante as fases iniciais de crescimento, quando os níveis de AL estão aumentados e, a atividade da PUMP diminuiu durante a fase final de maturação, quando estes níveis estão diminuídos (SLUSE *et al.*, 1998; SLUSE & JARMUSZKIEWICZ, 2000). Assim, um aumento nos níveis de AL durante a propagação das células de *A. angustifolia* não pode ser descartado, o que explicaria o efeito menos pronunciado do BSA no meio de isolamento das mitocôndrias (dados não mostrados).



**FIGURA 16. EFEITO DO ESTRESSE PELO FRIO SOBRE A ATIVIDADE DA AOX – ENSAIOS DE CONSUMO DE OXIGÊNIO**

FONTE: O autor (2012).

NOTA: **A.** Controle sem estresse ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ). **B e C.** Estresse pelo frio ( $4 \pm 1^\circ\text{C}$ ) por 24 h e 48 h respectivamente. A suspensão mitocondrial ( $0.5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) foi adicionada ao meio de reação padrão (item 5.9 de Materiais e Métodos) suplementado com oligomicina  $2.5 \text{ } \mu\text{g.mg}^{-1}$  de proteína, atractilósido  $20 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ , propranolol  $300 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ , DTT  $1 \text{ mmol.L}^{-1}$ , Piruvato  $0.1 \text{ mmol.L}^{-1}$ , BSA  $0.5 \text{ g\%}$  (m/v) e  $\text{MgCl}_2$   $1 \text{ mmol.L}^{-1}$ . A reação foi iniciada pela adição dos substratos malato  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$  e glutamato  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$ . Outras adições foram: CN  $1 \text{ mmol.L}^{-1}$  e SHAM  $1 \text{ mmol.L}^{-1}$  como indicado na figura. A figura é representativa de 4 experimentos independentes realizados em triplicatas. O número entre parêntese corresponde as velocidades de consumo de O<sub>2</sub> expressas em  $\text{nmol O}_2.\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$  de proteína mitocondrial.

Alterações diferenciais na atividade da AOX e PUMP não são exclusivas da *A. angustifolia*. No trigo durum (*Triticum durum*), por exemplo, durante o estresse oxidativo induzido na resposta ao déficit hídrico,  $H_2O_2$  e  $O_2^{\bullet-}$  promovem um efeito similar ao observado para o estresse pelo frio aqui observado, ocasionando um aumento da atividade da PUMP e nenhuma ou pouca alteração sobre a atividade da AOX (PASTORE *et al.*, 2007). González-Meler e colaboradores (1999) demonstraram que na soja (*Glycine max* L. cv Ransom) o estresse pelo frio (14°C) também não promoveu aumentos significativos na atividade da AOX, resultado similar ao obtido no presente estudo. Estes autores não avaliaram a atividade da PUMP. Já em *Arabidopsis* (MAIA *et al.*, 1998), tubérculos de batata (*Solanum tuberosum*) (LALOI *et al.*, 1997) e “skunk cabbage” ou repolho de gambá (*Symplocarpus foetidus*) (ITO, 1999), o estresse pelo frio (4°C) promoveu um aumento da atividade PUMP, porém, a atividade da AOX não foi determinada.

Ainda, ao considerar que o estresse por baixas temperaturas promove o aumento da produção de ROS e que a PUMP desempenha um papel crucial na proteção contra estas espécies (KOWALTOWSKI *et al.*, 1998; CALEGARIO *et al.*, 2003; MURPHY *et al.*, 2003; CONSIDINE *et al.*, 2003; SMITH *et al.*, 2004; VERCESI *et al.*, 2006), os resultados obtidos neste estudo sugerem que o aumento da atividade desta proteína pode estar envolvido em um mecanismo de proteção para evitar danos por ROS nas células *A. angustifolia*.

Investigações adicionais serão necessárias para compreender o significado e o papel dos sistemas dissipadores de energia (PUMP e AOX) nas diferentes condições de estresse e em diferentes plantas.

#### 6.4 EFEITO DO ESTRESSE PELO FRIO NA ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES

Os resultados apresentados mostraram a ativação da PUMP em resposta ao estresse pelo frio, possivelmente associado ao aumento dos níveis de ROS. Desta forma, tornou-se importante avaliar também a atividade das enzimas antioxidantes, particularmente a catalase, MnSOD, APX e GR em mitocôndrias isoladas. Nestes ensaios, as preparações mitocondriais foram

submetidas a uma etapa de purificação em gradiente de Percoll® para evitar a presença de enzimas provenientes de outros compartimentos celulares, como peroxissomos, cloroplastos e citosol (MILLAR *et al.*, 2001). Sabe-se que algumas isoformas destas enzimas estão presentes nestes compartimentos, como as da catalase, SOD, APX e GR (BOWLER *et al.*, 1992; SCANDALIOS, 1993; NOCTOR & FOYER, 1998; DUTILLEUL *et al.*, 2003; MITTLER *et al.*, 2004; GECHEV *et al.*, 2006; MØLLER *et al.*, 2007). É importante lembrar que os resultados descritos a seguir foram obtidos a partir de mitocôndrias isoladas de células embriogênicas de *A. angustifolia* metabolicamente viáveis, como assegurado pelos resultados dos experimentos de viabilidade (Figura 13).

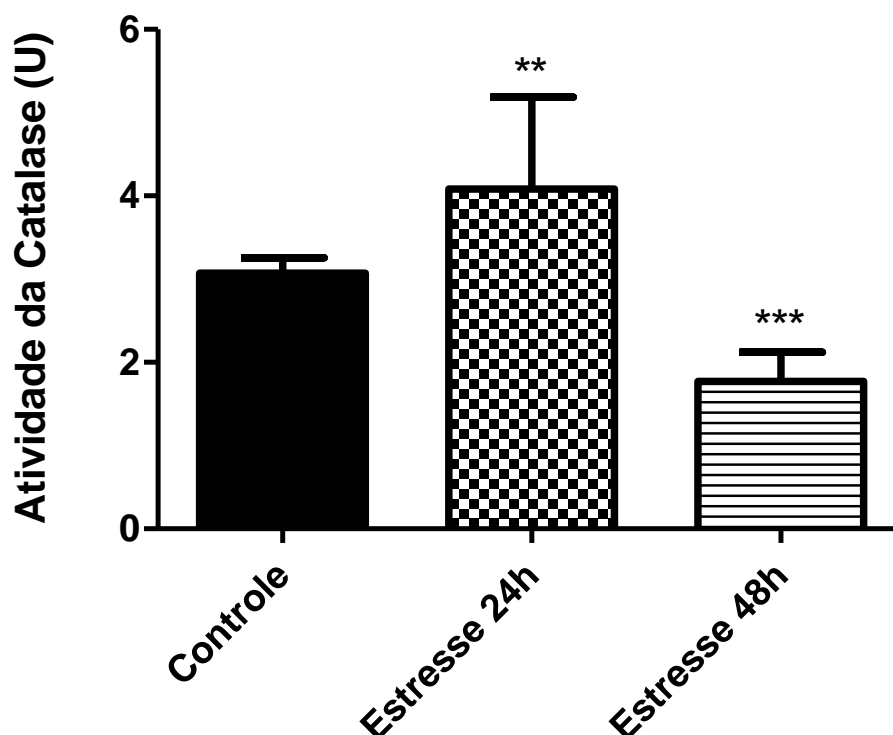
#### 6.4.1 Catalase (CAT)

A catalase possui um papel importante na proteção contra o estresse oxidativo por remover o excesso de  $H_2O_2$  (MITTLER, 2002; APEL & HIRT, 2004). O acúmulo de  $H_2O_2$  pode levar a formação do  $\cdot OH$  e este, por sua vez, a peroxidação lipídica. Ainda, o  $H_2O_2$  está envolvido com a abertura do poro de transição de permeabilidade (TPM), relacionado aos processos de indução de morte celular (TAI & LENTINI, 1998; KOWALTOWSKI & VERCESI, 1999; MØLLER & KRISTENSEN, 2004; RHOADS *et al.*, 2006).

Para avaliar o efeito do estresse pelo frio sobre a atividade da catalase, foram realizados experimentos com a mitocôndria íntegra e purificada. O estresse pelo frio de 24 h a 4°C promoveu um aumento na atividade da catalase em ~32%, em relação ao controle (Figura 17). No entanto, no maior tempo, de 48 h, a atividade da enzima foi reduzida em ~57% (Figura 17). Um aumento na atividade da catalase também foi descrito por Pinheiro e colaboradores (2004), em mitocôndrias isoladas de tubérculo de batata (*Solanum tuberosum* L. cv. Binje) submetidas ao estresse pelo frio de 4°C, porém, mais acentuado quando o estresse foi de cinco e dez dias. Os autores verificaram também o aumento na atividade da PUMP e AOX nas mesmas condições, sugerindo que estas proteínas teriam um importante papel na resposta ao estresse oxidativo, resultante da diminuição da temperatura. No

entanto, ao contrário do presente estudo, não foram feitas determinações dos níveis de ROS. Ainda, após 24 h de estresse pelo frio, Pinheiro e colaboradores não evidenciaram diferença significativa na atividade da AOX, mas pequenos incrementos na atividade da PUMP e catalase foram observados, resultados semelhantes a este estudo.

Os resultados apresentados na Figura 17, podem também ser interpretados em relação a aclimação da planta. Sabe-se que, durante o início da aclimação, em algumas espécies, ocorre um aumento da atividade da catalase para evitar que o  $H_2O_2$  acumule-se causando danos celulares. Por outro lado, níveis diminuídos desta enzima podem estar relacionados com a tolerância ao estresse pelo frio (PRASAD *et al.*, 1994; THOMASHOW, 1999).



**FIGURA 17. EFEITO DO ESTRESSE PELO FRIO SOBRE A ATIVIDADE DA CATALASE**

FONTE: O autor (2012).

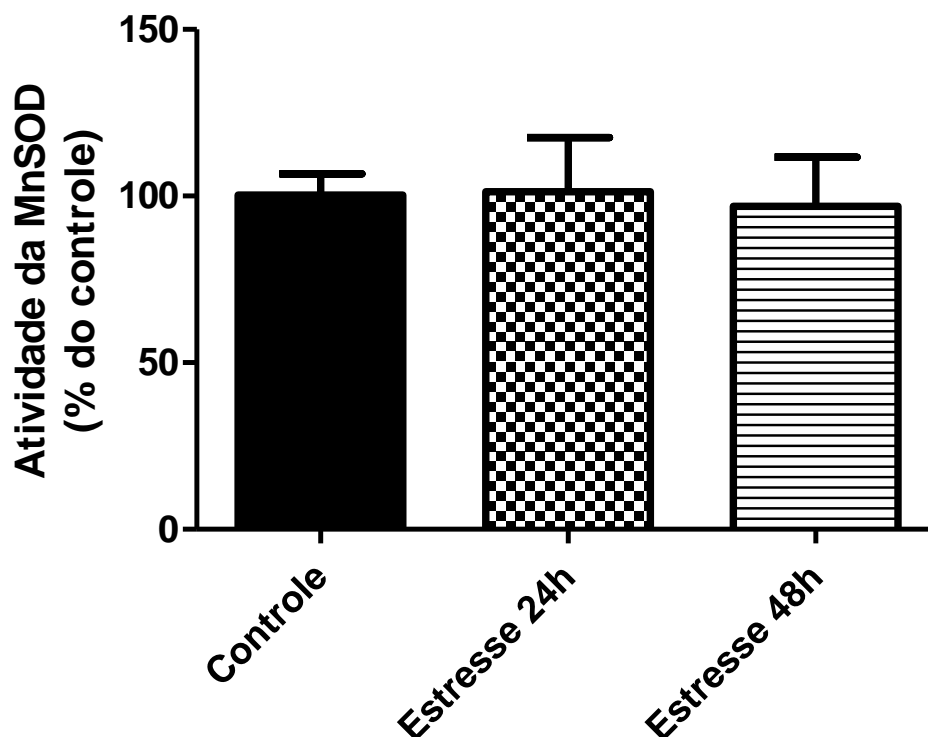
NOTA: Sistema de reação: tampão fosfato 50 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 mmol.L<sup>-1</sup> e 100 µg proteína.mL<sup>-1</sup> a 25°C. A reação foi iniciada pela adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e acompanhada a 240 nm durante 120 segundos nas condições indicadas. Controle: mitocôndrias isoladas de células cultivadas a 25 ± 1°C. Nas condições de estresse as células foram cultivadas a 4 ± 1°C, durante 24 h e 48 h. Os valores estão expressos em unidade de atividade (U), sendo que 1U corresponde a 1 µmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> decomposto (mg proteína.min<sup>-1</sup>) considerando o coeficiente de extinção molar do peróxido de 0,394 mmol<sup>-1</sup>.L.cm<sup>-1</sup>. Os valores correspondem a média ± dp de 3 experimentos independentes em quadruplicata. Valores significativamente diferentes do controle \*\**p*<0,01 e \*\*\**p*<0,001.

#### 6.4.2 Superóxido dismutase (MnSOD)

As superóxido dismutases são metaloproteínas que promovem a dismutação do  $O_2^{\bullet-}$ , em  $H_2O_2$  e  $O_2$  (BOWLER *et al.*, 1992). Existem em diferentes isoformas: CuZnSOD que são localizadas no cloroplasto, citosol e peroxissomos; MnSOD encontrada nas mitocôndrias e a FeSOD presente somente nos cloroplastos (BOWLER *et al.*, 1992; MITTLER *et al.*, 2004).

A atividade da MnSOD mitocondrial foi determinada em mitocôndrias purificadas e rompidas por ciclos de congelamento e descongelamento (MØLLER, 2001). A determinação foi feita através da autooxidação da epinefrina em pH 10,2, gerando  $O_2^{\bullet-}$  que, por sua vez, ativa a reação de autooxidação. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de proteína capaz de inibir em 50% a atividade da enzima e os resultados expressos em relação ao controle (100%).

Observa-se na Figura 18 que não houve diferença significativa na atividade da SOD em mitocôndrias provenientes das células submetidas ao estresse pelo frio de 24 h e 48 h a 4°C, em relação ao controle. Estes resultados estão de acordo com Lu e colaboradores (2007), que demonstraram que o estresse pelo frio de 5°C por 4 dias não promoveu diferença significativa na atividade da SOD em células de folhas da erva crofton (*Eupatorium adenophorum*), em comparação ao controle (25°C). No entanto, o fato de que não se tenha observado alterações na atividade da MnSOD não significa que isto não ocorra para as isoformas da enzima presentes em outros compartimentos celulares (PRASAD *et al.*, 1994; NOCTOR & FOYER, 1998). Neste sentido, Palma e colaboradores (2006) estudaram a atividade da SOD em diferentes organelas celulares como cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos de nódulos de plantas de ervilhas (*Pisum sativum* L.) submetidas aos estresse por senescência (12 semanas de crescimento). Em cloroplastos a SOD diminuiu ~57% em relação ao controle, já em peroxissomos o padrão oposto foi observado. Nesta organela a atividade da SOD foi aumentada em ~310% em relação ao controle. Em contraste, Não foram observadas diferenças significativas para a SOD mitocondrial em relação ao controle.



**FIGURA 18. EFEITO DO ESTRESSE PELO FRIO SOBRE A ATIVIDADE DA MnSOD**

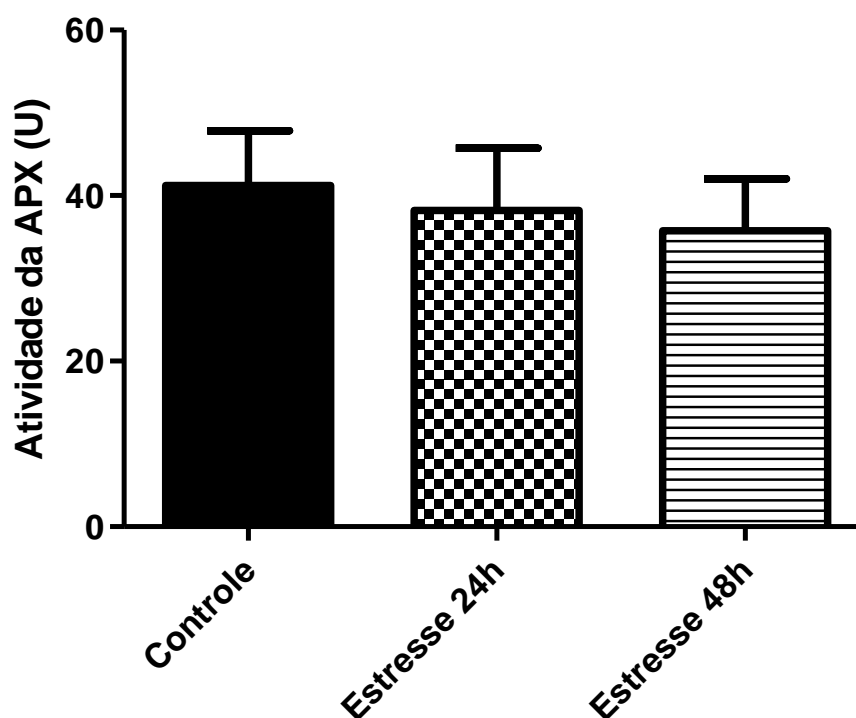
FONTE: O autor (2012).

NOTA: Sistema de reação: tampão carbonato 50 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 10,2, epinefrina 1 mmol.L<sup>-1</sup>, EDTA 0,1 mmol.L<sup>-1</sup> e proteína mitocondrial em quantidade adequada em um volume final de 1 mL a 30°C. A reação foi iniciada pela adição de epinefrina e acompanhada a 480 nm durante 120 segundos nas condições indicadas. Controle: mitocôndrias isoladas de células cultivadas a 25 ± 1°C. Nas condições de estresse as células foram cultivadas a 4 ± 1°C, durante 24h e 48h. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de proteína capaz de inibir em 50% a atividade da enzima. Os resultados foram expressos em relação ao controle, sendo o controle definido como 100% de atividade (1 unidade de SOD). Os valores correspondem a média ± dp de 3 experimentos independentes em quadruplicata.



#### 6.4.3 Ascorbato peroxidase (APX)

Para avaliar o efeito do estresse pelo frio sobre a atividade da APX, foram realizados experimentos com mitocôndrias purificadas e permeabilizadas com 0,01% (v/v) de Triton X-100. Observa-se na Figura 19 que não houve diferença significativa na atividade da APX em mitocôndrias provenientes das células submetidas ao estresse pelo frio de 24 h e 48 h, em relação às células controle. Resultado semelhante foi descrito para mitocôndrias de tubérculos de batata (*Solanum tuberosum* L. cv. Binje) (PINHEIRO *et al.*, 2004) após estresse de 4°C por 24 h. A ausência de efeitos do estresse pelo frio sobre a APX, pode estar relacionada as características desta enzima. Sabe-se que tanto a APX, como a catalase são fundamentais na remoção do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. No entanto, estas enzimas atuam de forma diferenciada. Sugere-se que a catalase seja responsável pela remoção do excesso de ROS durante o estresse (MITTLER, 2002), o que é compatível com o resultado da Figura 17, que mostra a ativação da enzima no estresse de 24 h. Portanto, é possível sugerir que a maior atividade da catalase foi capaz de diminuir os níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de forma a não promover a ativação da APX nesta condição (Figura 19). No entanto, o mesmo raciocínio não explica a falta de ativação desta enzima após 48 h de estresse, situação na qual a atividade da catalase estava reduzida (Figura 18).



**FIGURA 19. EFEITO DO ESTRESSE PELO FRIO SOBRE A ATIVIDADE DA ASCORBATO PEROXIDASE**

FONTE: O autor (2012).

NOTA: Sistema de reação: tampão fosfato 50 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7, ascorbato 22 µmol.L<sup>-1</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 µmol.L<sup>-1</sup>, e 100 µg proteína.mL<sup>-1</sup> a 25°C. A reação foi iniciada pela adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e acompanhada a 290 nm durante 120 segundos nas condições indicadas. Controle: mitocôndrias isoladas de células cultivadas a 25 ± 1°C. Nas condições de estresse as células foram cultivadas a 4 ± 1°C, durante 24 h e 48 h. Os valores estão expressos em unidade de atividade (U), sendo que 1U corresponde a 1 nmol de ascorbato oxidado (mg proteína.min<sup>-1</sup>) considerando o coeficiente de extinção molar do ascorbato de 2.8 mmol<sup>-1</sup>.L.cm<sup>-1</sup>. Os valores correspondem a média ± dp de 3 experimentos independentes em quadruplicata.

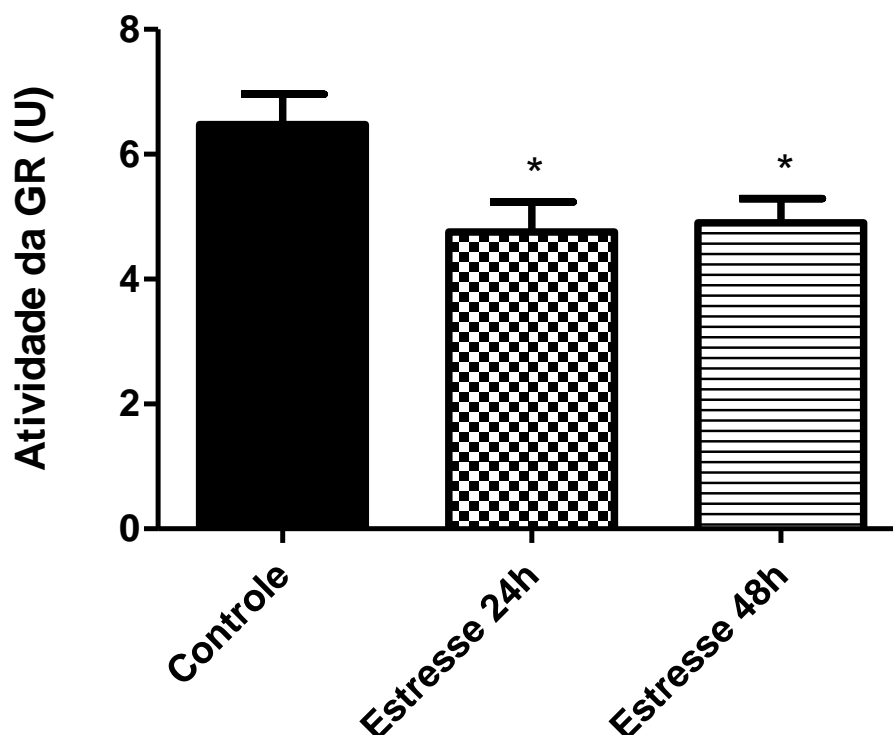
#### 6.4.4 Glutathione Redutase (GR)

A glutathione redutase desempenha um importante papel no sistema de defesa de plantas contra ROS. Esta enzima localiza-se predominantemente em cloroplastos, mas pequena quantidade também tem sido encontrada nas mitocôndrias e citosol. A GR catalisa a redução de GSSG a GSH utilizando NAD(P)H como agente redutor (Figura 7) (NOCTOR & FOYER, 1998; APEL & HIRT, 2004).

Neste ensaio foram utilizadas suspensões de mitocôndrias purificadas e permeabilizadas pela adição de deoxicolato 0,5% (m/v). Para avaliar a atividade da GR, acompanhou-se o consumo de NAD(P)H em 340 nm na presença de glutathione oxidada (GSSG).

A atividade da GR foi diminuída em aproximadamente 15% no estresse pelo frio de 24 h e 48 h (Figura 20). Resultado similar foi descrito por Fadzillah e colaboradores (1996), que avaliaram o efeito do estresse pelo frio a 4°C em culturas de brotos de arroz (*Oryza sativa*) sobre parâmetros relacionados ao estresse oxidativo, entre estes a atividade da GR. Os autores observaram uma diminuição da atividade da enzima em função do tempo de exposição ao frio, sendo a menor atividade observada em 8 dias.

Em relação a GR (Figura 20), cabe ressaltar que sua inibição promoveria efeitos mais significativos “*in vivo*”. Isto por que o bom funcionamento da enzima garante níveis adequados de GSH para formação de ascorbato pela DHAR. Por sua vez, o ascorbato é substrato da APX, que também poderia ser afetada (Figura 7). Por outro lado, estudos sobre a distribuição celular da GR, realizados em folhas de ervilha (*Pisum sativum* L.), evidenciaram que a atividade desta enzima na mitocôndria é corresponde somente a 3% do total, sendo o restante identificado no citosol (20%) e cloroplasto (77%) (EDWARDS *et al.*, 1990). Portanto, se isto for verdadeiro também para as células de *A. angustifolia*, a menor atividade da GR mitocondrial poderia ser compensada pelas demais isoformas e nenhum dano celular ocorreria (NOCTOR & FOYER, 1998).



**FIGURA 20. EFEITO DO ESTRESSE PELO FRIO SOBRE A ATIVIDADE DA GLUTATIONA REDUTASE**

FONTE: O autor (2012).

NOTA: Sistema de reação: tampão fosfato 100 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7, EDTA 1 mmol.L<sup>-1</sup>, GSSG 0,66 mmol.L<sup>-1</sup>, NADPH 0,075 mmol.L<sup>-1</sup> e 500 µg proteína.mL<sup>-1</sup> a 25°C. A reação foi iniciada pela adição de GSSG e acompanhada a 340 nm durante 300 segundos nas condições indicadas. Controle: mitocôndrias isoladas de células cultivadas a 25 ± 1°C. Nas condições de estresse as células foram cultivadas a 4 ± 1°C, durante 24 h e 48 h. Os valores estão expressos em unidade de atividade (U), sendo que 1U corresponde a 1 nmol de NADPH consumido (mg proteína.min<sup>-1</sup>) considerando o coeficiente de extinção molar do NADPH de 6220 mol<sup>-1</sup>.L.cm<sup>-1</sup>. Os valores correspondem a média ± dp de 3 experimentos independentes em quadruplicata. Valores significativamente diferentes do controle \**p*<0,05.

Nas células, a extensão do estresse oxidativo é determinada pelas quantidades de  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{O}_2^{\cdot-}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ , relacionadas diretamente ao equilíbrio das atividades da SOD, APX, GR. Alterações na atividade destas enzimas induzem mecanismos compensatórios. Por exemplo, quando a atividade da catalase é reduzida em plantas, as enzimas APX e GPX são expressas em maiores quantidades (APEL & HIRT, 2004). No presente estudo a única enzima que apresentou atividade aumentada foi a catalase na condição de estresse por 24 h. Por outro lado a GR teve sua atividade diminuída nas duas condições de estresse (24 h e 48 h). Como continuidade deste estudo, seria interessante avaliar a atividade total destas enzimas nas células de *A. angustifolia* nas condições de estresse aqui utilizadas, bem como a expressão destas enzimas. Estes resultados iriam contribuir para elucidar os mecanismos envolvidos na resposta desta planta ao estresse por baixa temperatura.

## 6.5 EFEITO DO ESTRESSE PELO FRIO SOBRE OS NÍVEIS ROS

Diferentes tipos de estresses (osmótico, senescência, estresse por variação de temperatura, déficit hídrico, exposição à radiação ultravioleta e ataque por patógenos) parecem induzir a um padrão de resposta semelhante nas plantas, promovendo um aumento na produção de ROS que pode resultar na indução de mecanismos de tolerância ou, ao promover injúria, desencadear processos envolvidos na morte celular (PRASAD *et al.*, 1994; NOGUEIRA, 2004; TAYLOR *et al.*, 2005; RHOADS *et al.*, 2006; PASTORE *et al.*, 2007).

O estresse oxidativo ocorre quando há um aumento dos níveis de ROS devido a um desequilíbrio entre geração destas espécies e as defesas antioxidantes (CADENAS, 1997; TAIZ & ZEIGER, 2009; NOGUEIRA, 2004; TAYLOR *et al.*, 2005).

No presente estudo, os níveis de ROS foram determinados em mitocôndrias isoladas e purificadas utilizando a sonda DCFH-DA. Esta sonda ao entrar na mitocôndria sofrer a ação de esterases convertendo em diclorofluoresceína reduzida (DCFH) que, por sua vez, quando em presença de ROS é oxidada a diclorofluoresceína (DCF) emitindo fluorescência. A intensidade da fluorescência do DCF é proporcional à quantidade de ROS

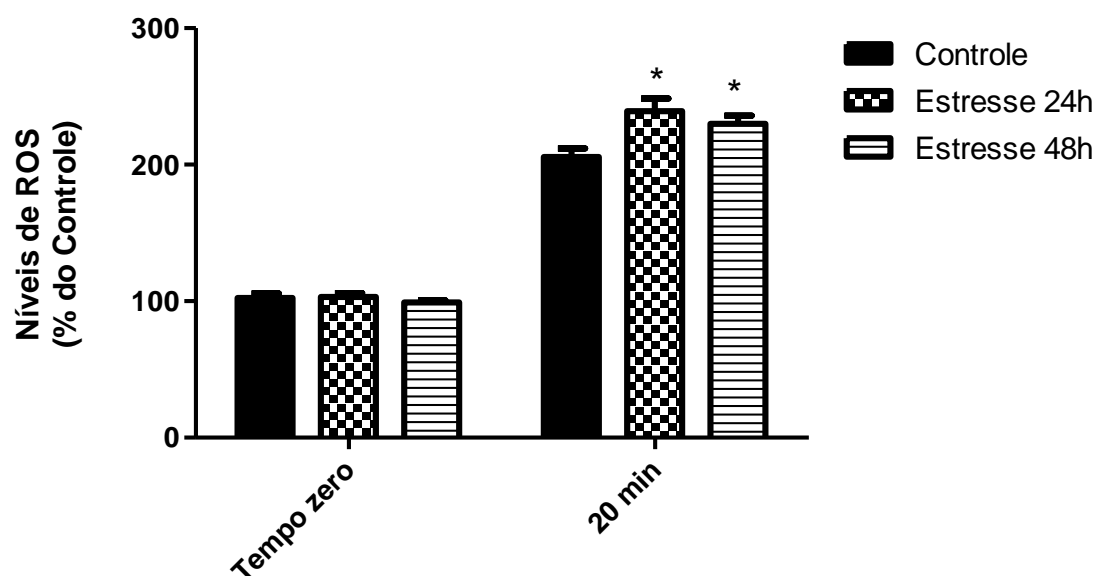
mitocondrial (CHEN *et al.*, 2010). Esta metodologia tem sido amplamente utilizada para a detecção de ROS em plantas, preferencialmente de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, embora não seja específica para o mesmo (MAXWELL *et al.*, 1999; ESPOSTI, 2002; ARMSTRONG & WHITEMAN, 2007; CHEN *et al.*, 2010). A Figura 21 mostra que houve um aumento nos níveis de ROS em 25% e 15% para mitocôndrias de células submetidas ao estresse pelo frio por 24 h e 48 h, respectivamente. Em nível celular este resultado pode ser ainda mais pronunciado, uma vez que ROS podem ser geradas em outros compartimentos celulares, como nos cloroplastos e peroxissomos (MITTLER *et al.*, 2004; RHOADS *et al.*, 2006; MØLLER *et al.*, 2007). Neste contexto, é descrito um aumento nos níveis de ROS (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) para diferentes espécies submetidas ao estresse pelo frio: na cana de açúcar (*Saccharum officinarum*), culturas de brotos de arroz (*Oryza sativa*) (estresse a 4°C por 8 dias) e sementes de milho (*Zea mays*) (estresse a 4°C por 7 dias) (PRASAD *et al.*, 1994; FADZILLAH *et al.*, 1996; TAI & LENTINI, 1998). Entretanto, para efeito de comparação, deve-se também considerar as diferenças evolutivas entre as espécies, enquanto que a araucária é uma gimnosperma, a cana-de-açúcar (*S. officinarum*), o arroz (*O. sativa*) e o milho (*Z. mays*) são angiospermas e monocotiledôneas.

É interessante comparar os resultados dos níveis de ROS (Figura 21) aos da atividade da catalase (Figura 17). A maior atividade da enzima em 24 h, pode fazer parte da resposta ao aumento dos níveis de ROS nestas condições. Por outro lado, o aumento dos níveis de ROS pode ser, em parte, consequência da diminuição da atividade da GR (Figura 20). Neste sentido, é possível sugerir que a atividade diminuída de GR resultaria na diminuição de GSH, essencial para a atividade da glutathione peroxidase (NOCTOR & FOYER, 1998; APEL & HIRT, 2004; MITTLER *et al.*, 2004).

Embora no estresse pelo frio de 48 h tenha havido uma diminuição nas atividades da catalase e GR (Figuras 17 e 20) os níveis de ROS (Figura 21) não foram significativamente superiores aos observados em 24 h. Para a interpretação deste resultado, vale lembrar que a atividade da PUMP foi estimulada nas condições de estresse pelo frio de 24 h e 48 h (Figuras 14 e 15), sendo que neste último tempo de exposição ao estresse, tanto a atividade quanto a expressão da enzima foram mais pronunciadas (VALENTE *et al.*,

2012), o que poderia justificar o menor aumento dos níveis de ROS nesta condição.

Ainda, deve-se considerar que a medida de ROS neste estudo é apresentada apenas para o tempo de 20 minutos (Figura 21). Na verdade, determinações em diferentes tempos foram realizadas mas, a dispersão dos dados não permitiu que se chegasse a um resultado conclusivo. Para determinar com maior precisão os níveis de ROS, experimentos futuros, com outras sondas como DAB (3,3'-Diaminobenzidina – Sigma Aldrich®) e o Kit Amplex Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase (Molecular Probes) devem ser realizados (SCHECKHUBER *et al.*, 2011; SMITH *et al.*, 2011).



**FIGURA 21. EFEITO DO ESTRESSE PELO FRIO SOBRE OS NÍVEIS DE ROS**

FONTE: O autor (2012).

NOTA: Mitocôndrias foram incubadas no escuro com PBS (pH 7,4), rotenona  $1\mu\text{mol.L}^{-1}$  e DCFH-DA  $1\mu\text{mol.L}^{-1}$ . A reação foi iniciada pela adição de succinato  $10\text{ mmol.L}^{-1}$  e acompanhada durante 1200 minutos. Controle: mitocôndrias isoladas de células cultivadas a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ . Nas condições de estresse as células foram cultivadas a  $4 \pm 1^\circ\text{C}$ , durante 24 h e 48 h. A intensidade da fluorescência foi monitorada usando espectrofluorímetro usando os comprimentos de onda de 485 nm (excitação) e 530 nm (emissão). Os valores estão expressos em % do controle, sendo que 100% corresponde, no tempo zero, a  $102 \pm 17,54$ ;  $103,14 \pm 16,27$ ;  $99,09 \pm 8,07$  unidades de fluorescência, para controle, estresse 24h e 48h, respectivamente. Os valores representam a média  $\pm$  dp de 5 experimentos independentes em quintuplicata. Valores significativamente diferentes do controle \* $p < 0,05$ .



## 6.6 EFEITO DO ESTRESSE PELO FRIO SOBRE A LIPOPEROXIDAÇÃO

A peroxidação lipídica ou a lipoperoxidação, é um processo que envolve a degradação oxidativa de lípideos das membranas celulares por ROS. As membranas mitocondriais são particularmente susceptíveis a lipoperoxidação, já que são ricas em lípideos poliinsaturados e, por estarem num ambiente provido de oxigênio e metais (BUEGE & AUST, 1978; GUTTERIDGE, 1995; KOWALTOWSKI & VERCESI, 1999; HERMES-LIMA, 2004).

Neste estudo, os produtos da lipoperoxidação ferro-induzida foram quantificados através da reação com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), em mitocôndrias isoladas de células embriogênicas de *A. angustifolia*, submetidas ou não ao estresse pelo frio (4°C por 24 h e 48 h). No ensaio, a suspensão mitocondrial foi energizada com 2-oxoglutarato ( $\alpha$ -cetoglutarato), sendo que o vazamento de elétrons da cadeia respiratória dá origem ao ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ). Este, por sua vez, é convertido por ação da MnSOD a  $H_2O_2$ , que ao reagir com o ferro, através da reação de Fenton, origina radicais hidroxila ( $^{\bullet}OH$ ) iniciadores do processo lipoperoxidativo. Os radicais formados reagem com a cadeia lipídica dando origem a vários produtos finais, entre eles o malondialdeído. Neste processo, alguns produtos entre estes o malondialdeído reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA) formando substâncias que absorvem luz em 535 nm. Este método é frequentemente utilizado como medida da extensão lipoperoxidativa (HALLIWELL & CHIRICO, 1993; HODGES *et al.*, 1999).

Na Figura 22 pode-se observar que não houve diferença significativa nos valores de TBARS para as condições de estresse pelo frio de 24 h nos tempos testados quando comparado às mitocôndrias de células controle. A primeira vista estes resultados parecem contrários aos da produção de ROS (Figura 21), quando se observou um aumento na produção destas espécies. No entanto, deve-se considerar que nas mesmas condições experimentais, houve um aumento significativo (~32%) na atividade da catalase (Figura 17), que pode ter sido suficiente para reduzir os níveis de  $H_2O_2$  e, conseqüentemente de  $^{\bullet}OH$ , principal iniciador do processo de lipoperoxidação.

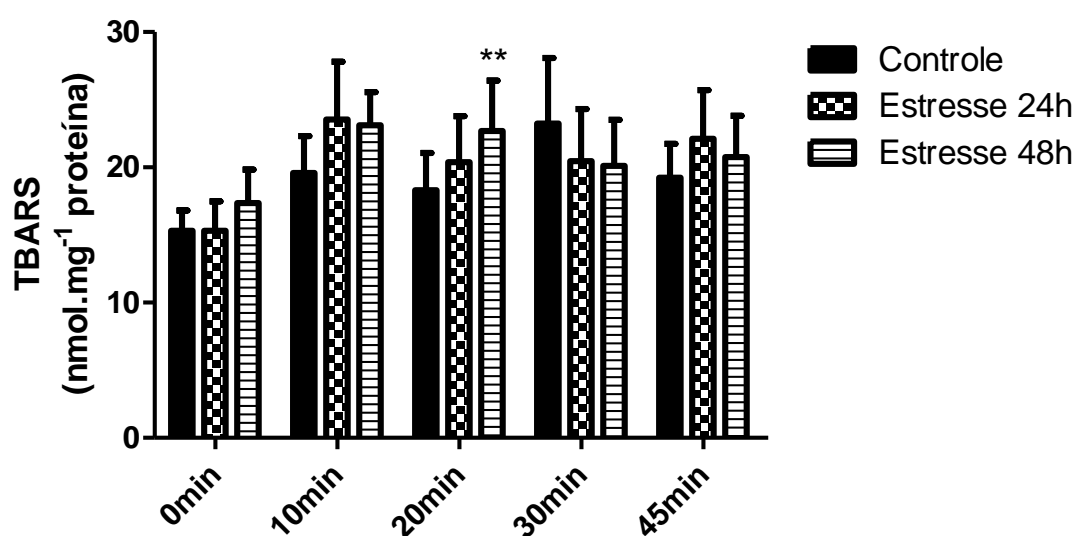
Por outro lado, o estresse pelo frio de 48 h causou um aumento de ~24% na produção de TBARS no tempo de 20 minutos. Este resultado, por

sua vez, é compatível a produção de ROS e também a menor atividade da catalase (57%) e GR (15%), nestas condições (Figuras 17 e 20).

A promoção de lipoperoxidação devido ao estresse pelo frio foi descrito por Lu e colaboradores (2007), porém, não em mitocôndrias isoladas. Estes autores, determinaram o nível de lipoperoxidação em células de folhas da erva crofton (*Eupatorium adenophorum*) submetidas ao estresse pelo frio de 5°C por 4 dias e observaram um aumento de ~15% nos níveis de TBARS, em comparação as células controle (25°C). Como no presente estudo, Lu et al., (2007) também demonstraram um aumento na atividade da catalase de ~17% nas condições de estresse pelo frio 5°C por 4 dias em relação ao controle. Já para a SOD o estresse pelo frio não promoveu diferença significativa em relação ao grupo controle (25°C). Para a APX e GR o estresse pelo frio de 5°C por 4 dias promoveu aumento de ~31% na atividade da APX e de ~9% na atividade da GR em relação ao controle 25°C. Os autores concluíram que o aumento coordenado das enzimas antioxidantes foi eficaz para proteger a erva crofton (*E. adenophorum*) do acúmulo de ROS a baixas temperaturas.

Na interpretação dos resultados de lipoperoxidação, deve-se considerar também que os efeitos nas células de *A. angustifolia* podem ser diferentes do observado em mitocôndrias isoladas, devido a produção de ROS e a presença de outras enzimas antioxidantes em outras organelas. Neste contexto, sabe-se que os níveis de ROS estão relacionados com a mobilidade destas moléculas entre os diferentes compartimentos celulares como nas mitocôndrias, cloroplastos e peroxissomos. Enquanto o  $O_2^{\bullet-}$  e o  $\bullet OH$  não apresentam mobilidade considerável, o  $H_2O_2$  pode migrar a uma boa distância do local de sua produção (GECHEV et al., 2006).

Os resultados da produção de ROS e lipoperoxidação sugerem que as condições de estresse foram capazes de induzir um aumento na produção de ROS ou que, mesmo havendo este aumento, os sistemas antioxidantes destas células foram provavelmente eficientes a ponto de neutralizar estas espécies.



**FIGURA 22. EFEITO DO ESTRESSE PELO FRIO SOBRE A LIPOPEROXIDAÇÃO FERRO-INDUZIDA**

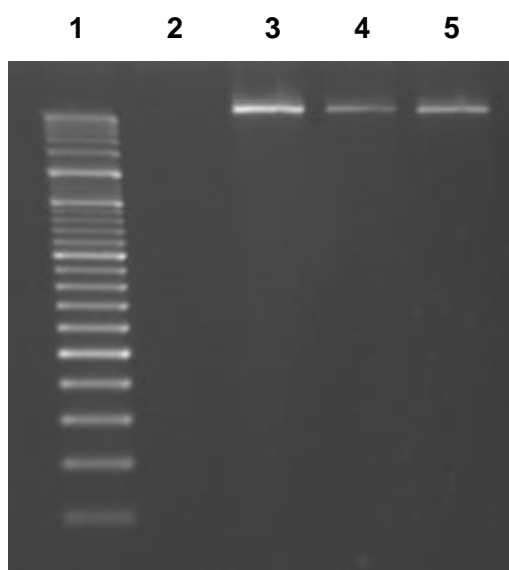
FONTE: O autor (2012).

NOTA: Sistema de reação: D-manitol 250 mmol.L<sup>-1</sup>, HEPES 10 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,2, FeCl<sub>3</sub> 0,2 mmol.L<sup>-1</sup>, e 0,5 mg proteína.mL<sup>-1</sup> a 37°C. A reação foi iniciada pela adição de 2-oxoglutarato 6 mmol.L<sup>-1</sup>. Após os tempos de incubação indicados a reação foi interrompida pela adição de BHT 0,012% (m/v). Controle: mitocôndrias isoladas de células cultivadas a 25 ± 1°C. Nas condições de estresse as células foram cultivadas a 4 ± 1°C, durante 24 h e 48 h. Os valores estão expressos em % do controle, sendo que 100% corresponde a 11,6 nmol de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) por mg<sup>-1</sup> de proteína mitocondrial. Os valores correspondem a média ± dp de 3 experimentos independentes em quadruplicata. Valores significativamente diferentes do controle \*\*p<0,01.

## 6.7 SEQUENCIAMENTO DO GENE DA AOX DE CÉLULAS EMBRIOGÊNICAS DE *A. angustifolia*

### 6.7.1 Extração e quantificação do DNA genômico

A partir dos procedimentos de extração do DNA, obteve-se um DNA com rendimento médio de  $400 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$ . A razão das leituras de absorbância em 260 e 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) situou-se aproximadamente entre 1,88 e 1,98 indicando baixa contaminação com polifenóis, polissacarídeos e proteínas. O DNA isolado foi submetido a eletroforese em gel de agarose, o qual evidenciou uma única banda sem arrastes, indicando a integridade do DNA (Figura 23). Estes resultados mostram que a pureza do DNA obtido foi satisfatória.



**FIGURA 23. PERFIL ELETROFORÉTICO EM GEL DE AGAROSE DO DNA DE *A. angustifolia***

FONTE: O autor (2012).

NOTA: Gel de agarose 1,4% (m/v) em TAE, corado com brometo de etídeo, contendo o DNA das células embriogênicas de *A. angustifolia*. Linha 1: marcador molecular O' Ranger Ruler da marca Fermentas; Linha 2: Água (controle negativo); Linha 3:  $80 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$  de DNA da araucária; Linha 4:  $8 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$  de DNA da araucária; Linha 5:  $40 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$  de DNA da araucária. As condições experimentais estão descritas no item 5.14.1 de Materiais e Métodos.

### 6.7.2 Isolamento dos genes da aox por PCR

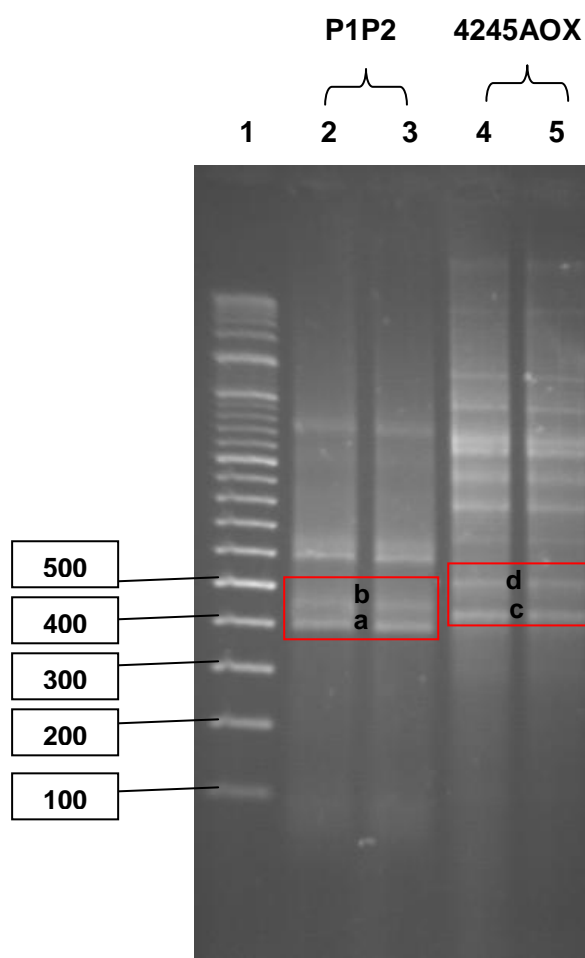
Após a obtenção do DNA genômico foram utilizados os *primers* P1, P2 e 42AOXF, 45AOXR (Tabela 1 e Figura 10) para as reações de amplificação por PCR. O amplificado do PCR utilizando a combinação entre os *primers* P1 e P2 corresponde a um fragmento de 444 pb e o amplificado do PCR utilizando a combinação entre os *primers* 42AOXF e 45AOXR corresponde a um fragmento de 432 pb (SAISHO *et al.*, 1997; FREDERICO *et al.*, 2009a). Os *primers* P1 e P2 (SAISHO *et al.*, 1997) foram desenhados utilizando como base a região conservada, correspondente ao exon 3, das sequências de aminoácidos da AOX de *Arabidopsis thaliana* (KUMAR & SOLL, 1992), “lírio voodoo” (*Sauromatum guttatum*) (RHOADS & McINTOSH, 1991), soja (*Glycine max*) (WHELAN *et al.*, 1993) e tabaco (*Nicotiana tabacum*) (VANLERBERGHE & McINTOSH, 1994; WHELAN *et al.*, 1995).

A amplificação do DNA gerado por PCR foi confirmada em gel de agarose com um fragmento de cerca de 450 pb (Figura 24) correspondente aos genes da aox. Logo após a obtenção deste resultado repetiram-se as reações de amplificação nas mesmas condições da primeira reação, de modo a obter DNA suficiente para ser utilizado na ligação ao vetor de clonagem.

As bandas do DNA correspondentes ao fragmento de 450 pb (bandas abaixo de 450 pb e bandas acima de 450 pb) foram extraídas do gel de agarose e purificadas. Dessa maneira, foram obtidas amostras com bandas abaixo (AB) e acima (AC) de 450 pb com os *primers* P1P2 (P1P2AB representado pela letra **a** e P1P2AC representado pela letra **b**) e bandas abaixo (AB) e acima (AC) com os *primers* 42AOXF e 45AOXR (4245AB representado pela letra **c** e 4245AC representado pela letra **d**). A concentração da solução obtida foi determinada para posteriormente se proceder à reação de ligação do fragmento ao vetor de clonagem.

Uma vez obtido o produto da reação de ligação foi efetuada a transformação das células competentes de *Escherichia coli* JM109. Os transformantes foram plaqueados em placas de ágar LB contendo ampicilina e X-gal. Dessa transformação, foram selecionadas as colônias brancas que possuem os clones aleatórios contendo o fragmento de interesse inicialmente

isolado por PCR.



**FIGURA 24. PERFIL ELETROFORÉTICO EM GEL DE AGAROSE MOSTRANDO OS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS ATRAVÉS DE PCR**

FONTE: O autor (2012).

NOTA: Gel de agarose 1,4% (m/v) em TAE, corado com brometo de etídeo, contendo os fragmentos de DNA purificados após amplificação com os seguintes *primers*: Linha 1: marcador molecular O' Ranger Ruler da marca Fermentas; Linha 2 e 3: *Primers* P1 e P2; Linha 4 e 5: *Primers* 42AOXF e 45AOXR. Retângulo em vermelho corresponde ao fragmento de 450 pb. As condições experimentais estão descritas no item 5.14.2 de Materiais e Métodos.

### 6.7.3 Clonagem dos genes da AOX e análise com enzimas de restrição

Para análise dos clones selecionados foram extraídos os plasmídios, os quais foram analisados em seguida, utilizando as enzimas de restrição: *EcoRI*, *HpyF3I* e *AluI* (Tabela 2). Numa primeira abordagem utilizou-se a enzima *EcoRI*, localizada na zona de clonagem múltipla do vetor (Figura 11), permitindo assim a seleção dos clones positivos, ou seja, os clones que

integravam um fragmento do mesmo tamanho do fragmento inicialmente amplificado. Destes, alguns integravam um fragmento de aproximadamente 450 pb (clones com apenas duas bandas visíveis no gel, correspondendo a mais pesada ao vetor e a outra ao fragmento clonado) (Figura 25 A). Em seguida foi realizada análise com as enzimas *HpyF3I* e *AluI* que permitiu selecionar adicionalmente os clones (Figura 25 B e C). Com estas enzimas foi possível selecionar 24 clones, dentre eles os clones P1P2AB (8 clones), P1P2AC (9 clones) e 4245AC (7 clones) (Figura 25 B e C).

<i>EcoRI</i>	<i>HpyF3I</i>	<i>AluI</i>
<b>G↓AATTC</b> <b>CTTAA↑G</b>	<b>C↓TNAG</b> <b>GANT↑C</b>	<b>AG↓CT</b> <b>TC↑GA</b>

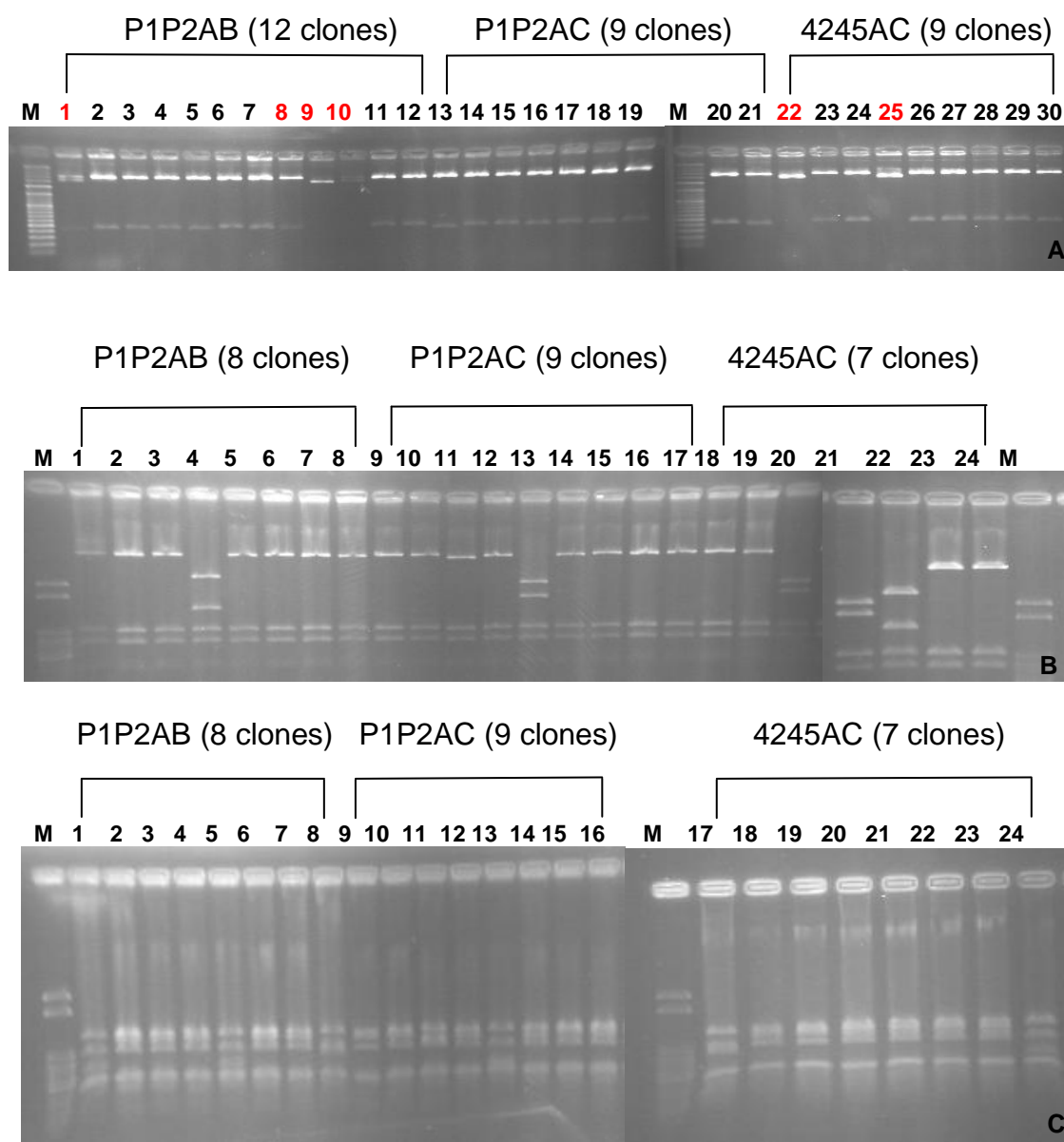
**TABELA 2. ENZIMAS DE RESTRIÇÃO UTILIZADAS NA ANÁLISE DO DNA DO PLASMÍDIO**

FONTE: O autor (2012).

NOTA: Enzimas de restrição utilizadas nas análises dos clones aleatórios recombinantes, e seus locais de restrição (setas vermelhas) nas sequências de DNA de *A. angustifolia* isoladas com os *primers* P1, P2 e 42AOXF, 45AOXR.

#### 6.7.4 Caracterização do gene da *aox*

A análise das 24 sequências de nucleotídeos apontou para a existência de 2 sequências distintas AaAOXcl5 (clone 5 P1P2AB) e AaAOXcl15 (clone 15 P1P2AC) (Figura 26) com 444 pb, tal como esperado para os *primers* P1 e P2 (SAISHO *et al.*, 1997; FREDERIDO *et al.*, 2009a) e com elevada homologia a genes da AOX disponíveis no GenBank do NCBI (Tabela 3). Devido ao insucesso no sequenciamento utilizando os *primers* 42AOXF e 45AOXR, mesmo após seguidas tentativas, optou-se por continuar somente com os *primers* P1 e P2.



**FIGURA 25. RESULTADOS DAS REAÇÕES DE DIGESTÃO DOS CLONES RECOMBINANTES UTILIZANDO AS ENZIMAS DE RESTRIÇÃO *EcoRI*, *HpyF3I* e *AluI***

FONTE: O autor (2012).

NOTA: Gel de agarose 1,4% (m/v) em TAE, corado com brometo de etídeo, contendo os clones recombinantes integrando o fragmento de interesse inicialmente isolado por PCR. **A.** Resultado da digestão com a enzima *EcoRI*. **B.** Resultado da digestão com a enzima *HpyF3I*. **C.** Resultado da digestão com a enzima *AluI*. Os clones que não foram selecionados encontram-se marcados em vermelho. A letra M corresponde ao marcador molecular O' Ranger Ruler da marca Fermentas.



Majority	CTGTAGCAGCAGTCCCTGGGATGGTAGGAGGGATGCTCCTCCACTGCAAGTCCCTTAGGAAATTCCAGCACAGTGGGGGA	
	10 20 30 40 50 60 70 80	
AaAOX_cl5	CTGTAGCAGCAGTCCCTGGGATGGTAGGAGGGATGCTCCTCCACTGCAAGTCCCTTAGGAAATTCCAGCACAGTGGGGGA	80
AaAOX_cl15	CTGTAGCAGCAGTCCCTGGGATGGTAGGAGGGATGCTCCTCCACTGCAAGTCCCTTAGGAAATTCCAGCACAGTGGGGGA	80
Majority	TGGATAAAGGCTCTTTTAGAGGAAGCAGAGAACGAGAGGATGCACCTCATGACATTCATGGAGGTAGCAAAGCCCTGATG	
	90 100 110 120 130 140 150 160	
AaAOX_cl5	TGGATAAAGGCTCTTTTAGAGGAAGCAGAGAACGAGAGGATGCACCTCATGACATTCATGGAGGTAGCAAAGCCCTGATG	160
AaAOX_cl15	TGGATAAAGGCTCTTTTAGAGGAAGCAGAGAACGAGAGGATGCACCTCATGACATTCATGGAGGTAGCAAAGCCCTGATG	160
Majority	GTACGAAAGAGCTTTGGTGTTTACAGTGCAAGGAGTCTTCTTCAATGCCTACTTCATCCTCTATATGATTTCGCCCAAGC	
	170 180 190 200 210 220 230 240	
AaAOX_cl5	GTACGAAAGAGCTTTGGTGTTTACAGTGCAAGGAGTCTTCTTCAATGCCTACTTCATCCTCTATATGATTTCGCCCAAGC	240
AaAOX_cl15	GTACGAAAGAGCTTTGGTGTTTACAGTGCAAGGAGTCTTCTTCAATGCCTACTTCATCCTCTATATGATTTCGCCCAAGC	240
Majority	TGGCTCACAGGATTGTGGGTTATCTCGAGGAAGAAGCCATCCACTCGTATACTGAATTTCTCAAGGAAGTGGACGATGGT	
	250 260 270 280 290 300 310 320	
AaAOX_cl5	TGGCTCACAGGATTGTGGGTTATCTCGAGGAAGAAGCCATCCACTCGTATACTGAATTTCTCAAGGAAGTGGACGATGGT	320
AaAOX_cl15	TGGCTCACAGGATTGTGGGTTATCTCGAGGAAGAAGCCATCCACTCGTATACTGAATTTCTCAAGGAAGTGGACGATGGT	320
Majority	AACGTTCCAACGTGCCAGCACCAGCCATAGCCATAGATTACTGGAAGCTTCCGAAGGATTCAACCTAAGAGATGTGGT	
	330 340 350 360 370 380 390 400	
AaAOX_cl5	AACGTTCCAACGTGCCAGCACCAGCCATAGCCATAGATTACTGGAAGCTTCCGAAGGATTCAACCTAAGAGATGTGGT	400
AaAOX_cl15	AACGTTCCAACGTGCCAGCACCAGCCATAGCCATAGATTACTGGAAGCTTCCGAAGGATTCAACCTAAGAGATGTGGT	400
Majority	GATGATAATCAGAGCTGACGAGGCTCATCATCGTGATGTAAACC	
	410 420 430 440	
AaAOX_cl5	GATGATAATCAGAGCTGACGAGGCTCATCATCGTGATGTAAACC	444
AaAOX_cl15	GATGATAATCAGAGCTGACGAGGCTCATCATCGTGATGTAAACC	444

**FIGURA 26. ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS DA AOX DOS CLONES AaAOXcl5 E AaAOXcl15**

FONTE: O autor (2012).

NOTA: O alinhamento foi obtido no programa Bioedit. Os nucleotídeos que diferem nas sequências estão assinalados em preto.

A sequência da AOX da *A. angustifolia* referente a região conservada do exon 3 e contendo o fragmento de 444 pb foi depositada no banco de dados do GenBank (NCBI) com o número de acesso JQ762252. É importante destacar, que foi sequenciado somente uma parte do gene da AOX, 444 pb, e que serão necessários novos sequenciamentos para completar a sequência.

Sequência	<i>Blastn</i> = nucleotídeo
AaAOXcl5	GQ380559.1 - <i>Pinus pinea</i> 1b = 84% NM_113135.3 - <i>Arabidopsis thaliana</i> 1a = 77% GQ380556.1 - <i>Pinus pinea</i> 1a = 73%
AaAOXcl15	GQ380559.1 - <i>Pinus pinea</i> 1b = 84% NM_113135.3 - <i>Arabidopsis thaliana</i> 1a = 77% GQ380557.1 - <i>Pinus pinea</i> 1a = 73%

**TABELA 3. NÍVEIS DE IDENTIDADE DAS SEQUÊNCIAS DA AOX DE *A. angustifolia***

FONTE: O autor (2012).

NOTA: Níveis de identidade encontrada entre as sequências da AOX de *Araucaria angustifolia* e sequências homólogas da AOX de plantas publicadas no banco de dados do NCBI.

O sequenciamento dos genes dos clones AaAOXcl5 e AaAOXcl15 permitiu constatar que traduziam a mesma proteína (Figura 27), não correspondendo, por isso, a genes distintos.

As sequências de AaAOXcl5 e AaAOXcl15 compartilharam maior semelhança com a AOX de outra espécie de gimnosperma o pinheiro manso (*Pinus pinea*) (FREDERICO *et al.*, 2009a) variando entre 84 e 73% em nível de nucleotídeos e entre 89%, 85% e 78% em nível de proteína (Tabelas 3 e 4).

Esta análise das proteínas revelou um “*stop codon*” ou códon de parada na posição 52 da sequência AaAOXcl5 onde era traduzido o aminoácido R (arginina) na AaAOXcl15, devido a isso foi utilizado somente a sequência AaAOXcl15 para construir a árvore filogenética. Uma das prováveis explicações para este “*stop codon*” é que ele é decorrente de artefatos do sequenciamento, pois durante as etapas do sequenciamento podem ocorrer mutações. Entretanto, o “*stop codon*” (TGA) foi localizado na posição 156 da sequência de nucleotídeos do clone 5 e também foi encontrado para as

sequências da AOX da cultivar portuguesa oliveira (*Olea europaea*) e foi denominado de mutação *nonsense* (MACEDO *et al.*, 2009). Essa mutação foi encontrada na posição 248 e 249, no exon 3, convertendo o ATC em um “*stop codon*” (TGA) no aminoácido 85 (MACEDO *et al.*, 2009).

A consequência de mutações *nonsense* não é a síntese de proteínas truncadas, mas sim o reconhecimento de transcritos sem sentido e a sua degradação (CONTI & IZAURRALDE, 2005). Este mecanismo parece garantir que apenas as proteínas de tamanho completo sejam produzidas (BYERS, 2002; FRISCHMEYER & DIETZ, 1999).

Majority	VAAPGMVGGMLLHCKSLRKFOHSGGWIKALLEEAENERMHLMTFIEVAKPRWYERALVFTVQGVFFNAYFILYMISPKL	
	10 20 30 40 50 60 70 80	
AaAOX_c15	VAAPGMVGGMLLHCKSLRKFOHSGGWIKALLEEAENERMHLMTFIEVAKPRWYERALVFTVQGVFFNAYFILYMISPKL	80
AaAOX_c115	VAAPGMVGGMLLHCKSLRKFOHSGGWIKALLEEAENERMHLMTFIEVAKPRWYERALVFTVQGVFFNAYFILYMISPKL	80
Majority	AHRIVGYLEEEAIHSYTEFLKELDDGNVNPVAPAPAIADYWKLPKDSTLRDVMIIKADEAHHRDVN	
	90 100 110 120 130 140	
AaAOX_c15	AHRIVGYLEEEAIHSYTEFLKELDDGNVNPVAPAPAIADYWKLPKDSTLRDVMIIKADEAHHRDVN	147
AaAOX_c115	AHRIVGYLEEEAIHSYTEFLKELDDGNVNPVAPAPAIADYWKLPKDSTLRDVMIIKADEAHHRDVN	147

## FIGURA 27. ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DA AOX DOS CLONES AaAOXc15 E AaAOXc115

FONTE: O autor (2012).

NOTA: O alinhamento foi obtido no programa Bioedit. Os nucleotídeos que diferem nas sequências estão assinalados em preto. O “*stop codon*” está representado por um ponto.

Sequência	<i>Blastp</i> = proteína
AaAOXcl5	ACV60640.1 - <i>Pinus pinea</i> 1b = 89% AAB49302.1 - <i>Arabidopsis thaliana</i> 1a = 87% ACV60633.1 - <i>Pinus pinea</i> 1a = 85% ACV60641.1 - <i>Pinus pinea</i> 2 = 79%
AaAOXcl15	ACV60640.1 - <i>Pinus pinea</i> 1b = 89% NP_188876.1 - <i>Arabidopsis thaliana</i> 1a = 87% ACV60633.1 - <i>Pinus pinea</i> 1a = 86% ACV60641.1 - <i>Pinus pinea</i> 2 = 78%

**TABELA 4. NÍVEIS DE IDENTIDADE DAS SEQUÊNCIAS DA AOX DE *A. angustifolia***

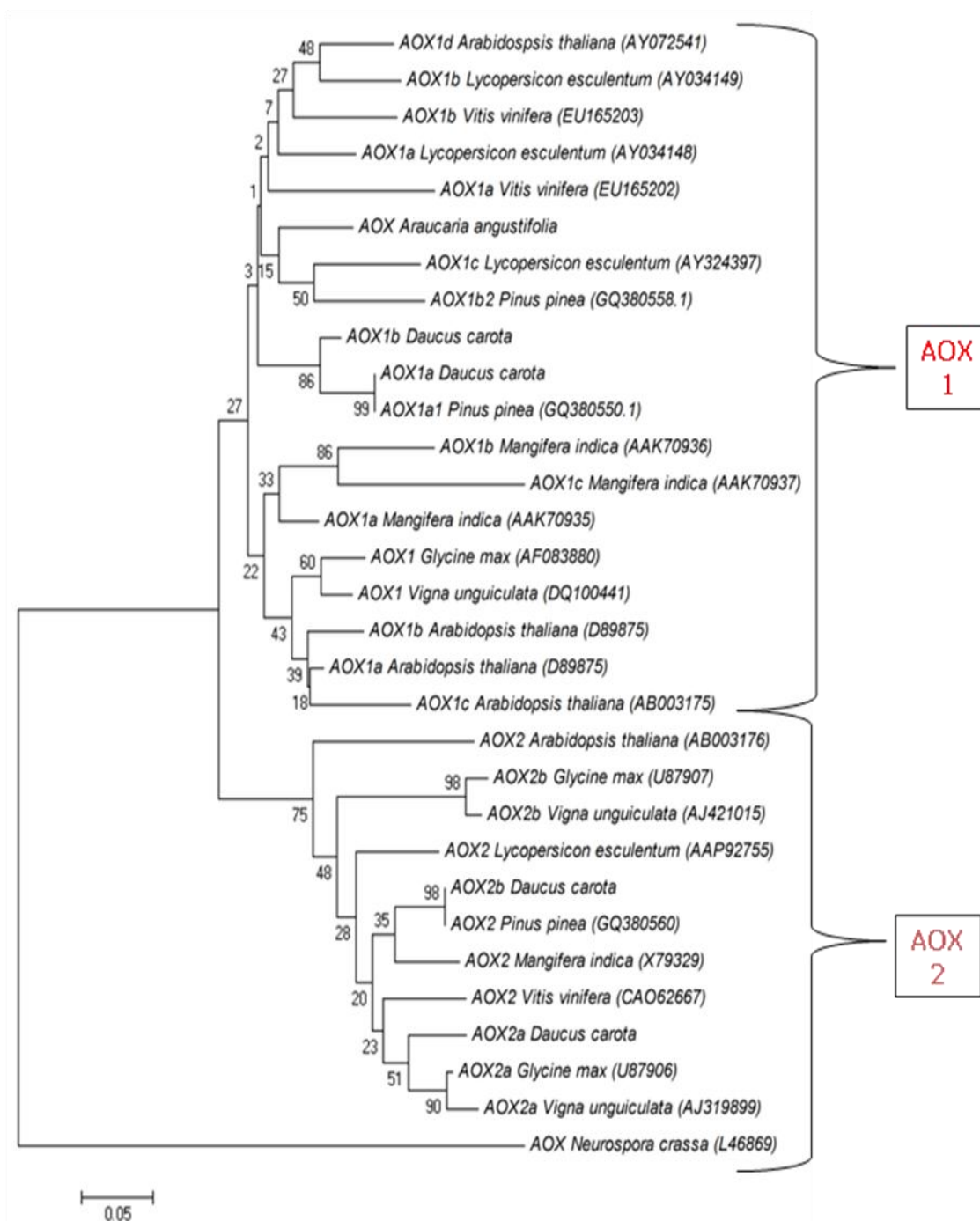
FONTE: O autor (2012).

NOTA: Níveis de identidade encontrada entre as sequências da AOX de *Araucaria angustifolia* e sequências homólogas da AOX de plantas publicadas no banco de dados do NCBI.

Uma vez obtidas as regiões codificantes foi possível construir uma árvore filogenética (Figura 28). Apesar das características comuns à família de genes da AOX, relacionadas com a localização celular e função da enzima, o alinhamento de sequências e análise filogenética mostrou genes agrupados em duas sub-famílias AOX1 e AOX2. Na araucária é possível confirmar a existência de apenas 1 proteína distinta, correspondendo a AOX1 (AaAOXcl15).

O dendrograma representa as relações evolutivas entre AOX deduzidas a partir de plantas e fungos.

A identificação da AOX em plantas e fungos resultou em um grande número de sequências da AOX que estão disponíveis para análises nos bancos de dados. O alinhamento das sequências da AOX de gimnosperma e angiospermas constituem um estudo importante e valioso que pode ser utilizado para identificação de aminoácidos e de domínios que podem desempenhar funções na regulação da proteína, especialmente quando esses dados são acoplados com o modelo estrutural (MAcDONALD, 2009).



**FIGURA 28. ÁRVORE FILOGENÉTICA DA AOX**

FONTE: O autor (2012).

NOTA: As sequências foram alinhadas com alinhamento múltiplo ClustalW em *software* BioEdit. Os alinhamentos foram feitos com 1000 repetições por *Neighbor-Joining* método usando o *software* 3.1 MEGA. O fungo *Neurospora crassa* foi utilizado como um grupo externo. A barra de escala indica a quantidade relativa de variação ao longo dos ramos. As AOX provenientes de vegetais são divididas em dois grupos (AOX1 e AOX2). Números de acesso estão em parênteses.

## 7. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos é possível concluir que:

1. O estresse pelo frio de 4°C por 24 h e 48 h não altera a viabilidade das células embriogênicas de *A. angustifolia*;

2. Em mitocôndrias isoladas de células de *A. angustifolia* expostas ao estresse pelo frio ( $4 \pm 1^\circ\text{C}$ ):

a) ocorre um estímulo na atividade da PUMP, sem alteração na atividade da AOX, após 24 h e 48 h de estresse;

b) no estresse de 24 h, o estímulo sobre a PUMP, bem como o aumento da atividade da catalase, pode ter ocorrido em resposta ao aumento dos níveis de ROS, observado nestas condições;

c) o aumento dos níveis de ROS está possivelmente associado à diminuição da atividade da enzima glutathione redutase nos tempos de 24 h e 48 h de estresse;

d) as atividades das enzimas SOD e APX não são alteradas pelas condições de estresse, sugerindo que não estão envolvidas na resposta a esta condição;

e) o estímulo da PUMP e da catalase em 24 h não é suficiente para evitar a lipoperoxidação, observada após 48 h de estresse;

3. A AOX de *A. angustifolia* possui um segmento de 444 pb na região conservada do exon 3 que a classifica como AOX1.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods Enzymol.**, v. 105, p. 121-126, 1984.
- AHMAD, P.; SARWAT, M.; SHARMA, S. Reactive oxygen species, antioxidants and signaling in plants. **J. Plant Biol.**, v. 51, n. 3, p. 167-173, 2008.
- ÅKERMAN K.E.O.; WIKSTRÖM M.K.F. Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential. **FEBS Let.**, v. 68, p. 191-197, 1976.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.**, v. 215, p. 403-410, 1990.
- ANDRAE, F. H.; KRAPPENBAUER, A. **Inventário de um reflorestamento de araucária de 17 anos, em Passo Fundo – RS: inventário de nutrientes.** In: PESQUISAS AUSTROBRASILEIRAS 1973-1982 SOBRE *Araucaria angustifolia*, *Podocarpus lambertii* e *Eucalyptus saligna*, 1983, Santa Maria. **Proceedings...**Santa Maria: Imprensa Universitária, 1983. 112 p.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 55, p. 373–399, 2004.
- ARMSTRONG, J.S.; WHITEMAN, M. Measurement of reactive oxygen species in cells and mitochondria. **Methods in Cell Biol.** Academic Press, 2007, v. 80; Chapter 18. 2007.
- ARNHOLDT-SCHMITT, B. AOX – a functional marker for efficient cell reprogramming under stress? **TRENDS Plant Sci.**, v. 11, n. 6, 2006.
- ASTARITA, L.V.; GUERRA, M.P. Early somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia* - Induction and maintenance of embryonal - suspensor mass culture. **Revista Bras. Fisiol. Vegetal**, v. 10, n. 2, p. 113-118, 1998.

ASTARITA, L.V.; GUERRA, M.P. Conditioning of culture medium by suspension cells and formation of somatic proembryo in *Araucaria angustifolia* (Coniferae). **In Vitro Cell Dev. Biol. Plant**, v. 36, p. 194-200, 2000.

BAKER, C.J.; MOCK, N.M. An Improved method for monitoring cell-death in cell-suspension and leaf disc assays using evans blue. **Plant Cell Tiss. Org.**, v. 39, p. 7-12, 1994.

BALBUENA, T.S.; SILVEIRA, V.; JUNQUEIRA, M.; DIAS, L.L.C.; SANTA-CATARINA, C.; SHEVCHENKO, A.; FLOH, E.I.S. Changes in the 2-DE protein profile during zygotic embryogenesis in the brazilian pine (*Araucaria angustifolia*). **J. Proteomics**, v. 72, p. 337-352, 2009.

BALBUENA, T.S.; JO, L.; PIERUZZI, F.P.; DIAS, L.L.C.; SILVEIRA, V.; SANTA-CATARINA, C.; JUNQUEIRA, M.; THELEN, J.J.; SHEVCHENKO, A.; FLOH, E.I.S. Differential proteome analysis of mature and germinated embryos of *Araucaria angustifolia*. **Phytochemistry**, v. 72, p. 302–311, 2011.

BEAVIS, A.D.; VERCESI, A.E. Anion uniport in plant-mitochondria is mediated by a  $Mg^{2+}$ -insensitive inner membrane anion channel. **J. Biol. Chem.**, v. 267, p. 3079–3087, 1992.

BEHLING, H. Late Quaternary vegetation, climate and fire history of the *Araucaria* forest and campos region from Serra Campos Gerais, Paraná state (South Brazil). **Rev. Palaeobot. Palynology**, v. 97, p. 109-121, 1997.

BEGCY, K.; MARIANO, E.D.; MATTIELLO, L.; NUNES, A.V.; MAZZAFERA, P.; MAIA, I.G.; MENOSSI, M. An *Arabidopsis* mitochondrial uncoupling protein confers tolerance to drought and salt stress in transgenic tobacco plants. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, p. 23776, 2011.

BIRNBOIM, H.C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic. Acids. Res.**, v. 24, p. 1513–1523, 1979.



BLUM, W. E. H. **Ecologia da *Araucaria angustifolia* e futuras condições de reflorestamento no Sul do Brasil**. Brasil Madeira, Curitiba, v. 7, p. 10-12, 1977.

BORECKÝ, J.; MAIA, I.G.; ARRUDA, P. Mitochondrial uncoupling proteins in mammals and plants. **Biosci. Rep.**, v. 21, n. 2, p. 201-212, 2001.

BORECKÝ, J.; VERCESI, A.E. Plant uncoupling mitochondrial protein and alternative oxidase: Energy metabolism and stress. **Biosci. Rep.**, v. 25, p. 271-286, 2005.

BORECKÝ, J.; NOGUEIRA, F.T.; OLIVEIRA, K.A.; MAIA, I.G.; VERCESI, A.E.; ARRUDA, P. The plant energy-dissipating mitochondrial systems: depicting the genomic structure and the expression profiles of the genes families of uncoupling protein and alternative oxidase in monocots and dicots. **J. Exp. Bot.**, v. 57, p. 849-864, 2006.

BOWLER, C.; VAN MONTAGU, M.; INZE, D. Superoxide dismutase and stress tolerance. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v. 43, p. 83-116, 1992.

BOZHKO, P.V.; FILINOVA, L.H.; VON ARNOLD, S. A key developmental switch during Norway spruce somatic embryogenesis is induced by withdrawal of growth regulators and is associated with cell death and extracellular acidification. **Biotec. Bioeng.**, v. 77, p. 658-667, 2002.

BRANDALISE, M.; MAIA, I.G.; BORECKÝ, J.; VERCESI, A.E.; ARRUDA, P. Overexpression of plant uncoupling mitochondrial protein in transgenic tobacco increases tolerance to oxidative stress. **J. Bioenerg. Biomembr.**, v. 35, p. 203–209, 2003.

BRANDALISE, M.; MAIA, I.D.; BORECKY, J.; VERCESI, A.E.; ARRUDA, P. ZmPUMP encodes a maize mitochondrial uncoupling protein that is induced by oxidative stress. **Plant Sci.**, v. 165, p. 329–335, 2003.

BUEGE, J.A.; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. IN: Fleischer, S.; Packer, L. **Methods Enzymol.** Academic Press, 1978, v. 52; Biomembranes, Part C.

BYERS, P.H. Killing the messenger: new insights into nonsense-mediated mRNA decay. **J. Clin. Invest.**, v. 109, p. 3–6, 2002.

CADENAS, E. Basic mechanisms of antioxidant activity. **Biofactors**, v. 6, p. 391-397, 1997.

CALEGARIO F.F.; COSSO R.G.; FAGIAN M.M.; ALMEIDA F.V.; JARDIM W.F.; JEZEK P.; ARRUDA P.; VERCESI A.E. Stimulation of potato tuber respiration by cold-stress is associated with an increased capacity of both plant uncoupling mitochondrial protein (PUMP) and alternative oxidase. **J. Bioenerg. Biomembr.**, v. 35, p. 211-220, 2003.

CAMPOS, M.D.; CARDOSO, H.G.; LINKE, B.; COSTA, J.H.; MELO, D.F.; JUSTO, L.; FREDERICO, A.M.; ARNHOLDT-SCHMITT, B. Differential expression and co-regulation of carrot AOX genes (*Daucus carota*). **Physiol. Plant.**, v. 137, p. 578–591, 2009.

CARVALHO, P.E.R. Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira. **EMBRAPA-CNPQ**, p. 70-80, 1994.

CASSOL, C. A. **Relações entre características do solo, crescimento e produtividade em povoamento implantado de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze.** Passo Fundo, 1982. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria.

CASTRO-CONCHA, L.A.; ESCOBEDO, R.M.; MIRANDA-HAM, M.L. Measurement of cell viability *in vitro* cultures, in: F.V.F. V. M. Loyola Vargas (Ed.). **Methods Mol. Biol.**, Humana Press Inc., Totowa, NJ, p. 71-76. 2006.

CHANCE, B.; WILLIAMS, G.R. The respiratory enzymes in oxidative phosphorylation: kinetics of oxygen utilization. **J. Biol. Chem.**, v. 217, p. 383–393, 1955.

CHAVES, I.; REGALADO, A.P.; CHEN, M.; RICARDO, C. P.; SHOWALTER, A. M. Programmed cell death induced by  $(\beta$ -galactosyl)<sub>3</sub> Yariv reagent in *Nicotiana tabacum* BY-2 suspension-cultured cells. **Physiol. Plant.**, v. 116, p. 548–553, 2002.

CHEN, X.; ZHONG, Z.; XU, Z.; CHEN, L.; WANG, Y. 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein as a fluorescent probe for reactive oxygen species measurement: Forty years of application and controversy. **Free Rad. Res.**, v. 44, n. 6, p. 587–604, 2010.

CHERRY, J.H. **Biochemical and cellular mechanisms of stress tolerance in plants**. Berlin: Springer-Verlag, 1994.

CLARKSON, A.B.; BIENEN, E.J.; POLLAKIS, G.; GRADY, R.W. Respiration of bloodstream forms of the parasite *Trypanosoma brucei* is dependent on a plant-like alternative oxidase. **J. Biol. Chem.**, v. 264, p. 17770–17776, 1989.

CLIFTON, R.; MILLAR, A.H.; WHELAN, J. Alternative oxidases in *Arabidopsis*: A comparative analysis of differential expression in the gene family provides new insights into function of non-phosphorylating bypasses. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1757, p. 730–741, 2006.

CONSIDINE, M.J.; HOLTZAPFFER, R.C.; DAY, D.A.; WHELAN, J.; MILLAR, A.H. Molecular distinction between alternative oxidase from monocots and dicots. **Plant Physiol.**, v. 129, p. 949–953, 2002.

CONSIDINE, M.J.; GOODMAN, M.; ECHTAY, K.S.; LALOI, M.; WHELAN, J. Superoxide stimulates a proton leak in potato mitochondria that is related to the activity of uncoupling protein. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 22298–22302, 2003.

CONTI, E.; IZAURRALDE, E. Nonsense-mediated mRNA decay: molecular insights and mechanistic variations across species. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 17, p. 316–325, 2005.

COSTA, J.H.; JOLIVET, Y.; HASENFRATZ-SAUDER, M.P.; ORELLANO, E.G.; LIMA, M.G.S.; DIZENGREMEL, P.; MELO, D.F. Alternative oxidase regulation in roots of *Vigna unguiculata* cultivars differing in drought/salt tolerance. **J. Plant Physiol.**, v. 164, p. 718–727, 2007.

COSTA, J.H.; CARDOSO, H.G.; CAMPOS, M.D.; ZAVATTIERI, A.; FREDERICO, A.M.; MELO, D.F.; ARNHOLDT-SCHMITT, B. *Daucus carota* L. – An old model for cell reprogramming gains new importance through a novel expansion pattern of alternative oxidase (AOX) genes. **Plant Physiol. Biochem.**, v. 47, p. 753–759, 2009.

COSTA, J.H.; MOTA, E.F.; CAMBURSANO, M.V.; LAUXMANN, M.A.; OLIVEIRA, L.M.N.; LIMA, M.G.S.; ORELLANO, E.G.; MELO, D.F. Stress-induced co-expression of two alternative oxidase (VuAox1 and 2b) genes in *Vigna unguiculata*. **J. Plant Physiol.**, v. 167, p. 561–570, 2010.

DAT, J.; VANDENABEELE, S.; VRANOVA, E.; VAN MONTAGU, M.; INZE, D.; BREUSEGEM, F.V. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 57, p. 779–795, 2000.

DESIKAN, R.; MACKERNESS, A.H.; HANCOCK, J.T.; NEILL, S.J. Regulation of the *Arabidopsis* transcriptome by oxidative stress. **Plant Physiol.**, v. 127, p. 159–172, 2001.

DUARTE, L.S.; DOS SANTOS, M.M.G.; HARTZ, S.M.; PILLAR, V.D. Role of nurse plants in *Araucaria* forest expansion over grassland in south Brazil. **Austral Ecol.**, v. 31, p. 520–528, 2006.

DURZAN, D.J. **Process control in somatic polyembryogenesis**. In: Hallgren, J.E. (Ed). *Frans Symposium Departament of Forest Genetics and Palnt*

Physiologi, Swedish. Proceedings... Swedish: University of Agricultural Sciences, v. 8, p. 147–186, 1988.

DUTILLEUL, C.; GARMIER, M.; NOCTOR, G.; MATHIEU, C.; CHÉTRIT, P.; FOYER, C.H.; PAEPE, R. Leaf mitochondria modulate whole cell redox homeostasis, set antioxidant capacity, and determine stress resistance through altered signaling and diurnal regulation. **Plant Cell**, v. 15, p. 1212–1226, 2003.

EDIDIN, M. A rapid, quantitative fluorescence assay for cell damage by cytotoxic antibodies. **J. Immunol.**, v. 104, p. 1303-1306, 1970.

EDWARDS, E.A.; RAWSTHORNE, S.; MULLINEAUX, P.M. Subcellular distribution of multiple forms of glutathione reductase in leaves of pea (*Pisum sativum* L.). **Planta**, v. 180, p. 278-284, 1990.

ELHAFEZ, D.; MURCHA, M.W.; CLIFTON, R.; SOOLE, K.L.; DAY, D.A.; WHELAN, J. Characterization of mitochondrial alternative NAD(P)H dehydrogenases in *Arabidopsis*: Intraorganelle location and expression. **Plant Cell Physiol.**, v. 47, n. 1, p. 43–54, 2006.

ELTHON, T.E.; McINTOSH, L. Characterization and solubilization of the alternative oxidase of *Sauromatum guttatum* mitochondria. **Plant Physiol.**, v. 80, p. 378-383, 1986.

ELTHON, T.E.; McINTOSH, L. Identification of the alternative terminal oxidase of higher plant mitochondria. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 84, p. 8300-8403, 1987.

ESPOSTI, M.D. Measuring mitochondrial reactive oxygen species. **Methods**, v. 26, p. 335-340, 2002.

ESTABROOK, R.W. Mitochondrial respiratory control and the polarography measurement of ADP/O ratios. In: **Methods Enzymol.**, v. 10, p. 41–47, 1967.

FADZILLAH, N.M.; GILL, V.; FINCH, R.V.; BURDON, R.H. Chilling, oxidative stress and antioxidant responses in shoot cultures of rice. **Planta**, v. 199, p. 552-556, 1996.

FIGUEIRA, T.R.S.; ARRUDA, P. Differential expression of uncoupling mitochondrial protein and alternative oxidase in the plant response to stress. **J. Bioenerg. Biomembr.**, v. 43, p. 67–70, 2011.

FILONOVA, L.H.; BOZHKO, P.V.; BRUKHIN, V.B.; DANIEL, G.; ZHIVOTOVSKY, B.; VON ARNOLD, S. Two waves of programmed cell death occur during formation and development of somatic embryos in the gymnosperm, Norway spruce. **J. Cell Sci.**, v. 113, p. 4399–4411, 2000a.

FILONOVA, L.H.; BOZHKO, P.V.; VON ARNOLD, S. Developmental pathway of somatic embryogenesis in *Picea abies* as revealed by time-lapse tracking. **J. Exp. Bot.**, v. 51, p. 249 - 264, 2000b.

FIORANI, F.; UMBACH, A.L.; SIEDOW, J.N. The alternative oxidase of plant mitochondria is involved in the acclimation of shoot growth at low temperature. A study of *Arabidopsis* AOX1a transgenic plants. **Plant Physiol.**, v. 139, p. 1795–1805, 2005.

FLEURY, C.; SANCHIS, D. The mitochondrial uncoupling protein-2: current status. **Internat. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 31, p. 1261–1278, 1999.

FONTOURA, S.B.; GANADE, G.; LAROCCA, J. Changes in plant community diversity and composition across an edge between *Araucaria* forest and pasture in south Brazil. **Revista Bras. Bot.**, v. 29, n. 1, p. 79-91, 2006.

FOYER, C.H.; LOPEZ-DELGADO, H.; DAT, J.F.; SCOTT, I.M. Hydrogen peroxide and glutathione-associated stress tolerance and signalling. **Physiol. Plant.**, v. 100, p. 241-254, 1997.

FOYER, C.H.; NOCTOR, G. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. **Physiol. Plant.**, v. 119, p. 355–364, 2003.

FREDERICO, A.M.; ZAVATTIERI, M.A.; CAMPOS, M.D.; CARDOSO, H.G.; MCDONALD, A.E.; ARNHOLDT-SCHMITT, B. The gymnosperm *Pinus pinea* contains both AOX gene subfamilies, AOX1 and AOX2. **Physiol. Plant.**, v. 137, p. 566–577, 2009a.

FREDERICO, A.M.; CAMPOS, M.D.; CARDOSO, H.G.; IMANI, J.; ARNHOLDT-SCHMITT, B. Alternative oxidase involvement in *Daucus carota* somatic embryogenesis. **Physiol. Plant.**, v. 137, p. 498–508, 2009b.

FRISCHMEYER, P.A.; DIETZ, H.C. Nonsense-mediated mRNA decay in health and diseases. **Hum. Mol. Genet.**, v. 8, p. 1893–1900, 1999.

GAPPER, C.; DOLAN, L. Control of plant development by reactive oxygen species. **Plant Physiol.**, v. 141, p. 341–345, 2006.

GARLID, K.D.; OROSZ, D.E.; MODRIANSKÝ, M.; VASSANELLI, S.; JÉZEK, P. On the mechanism of fatty acid-induced proton transport by mitochondrial uncoupling protein. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 2615–2620, 1996.

GECHEV, T.S.; HILLE, J. Hydrogen peroxide as a signal controlling plant programmed cell death. **J. Cell Biol.**, v. 168, p. 17–20, 2005.

GECHEV, T.S.; VAN BREUSEGEM, F.; STONE, J.M.; DENEV, I.; LALOI, C. Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. **BioEssays**, v. 28, p. 1091–1101, 2006.

GEISLER, D.A.; BROSELID, C.; HEDERSTEDT, L.; RASMUSSEN, A.G.  $\text{Ca}^{2+}$  binding and  $\text{Ca}^{2+}$  independent respiratory NADH and NADPH dehydrogenases of *Arabidopsis thaliana*. **J. Biol. Chem.**, v. 282, p. 28455–28464, 2007.

GONZÁLEZ-MELER, M.A.; RIBAS-CARBO, M.; GILES, L.; SIEDOW, J.N. The effect of growth and measurement temperature on the alternative respiratory pathway. **Plant Physiol.**, v. 120, p. 765-772, 1999.

GUERRA, M.P.; SILVEIRA, V.; SANTOS, A.L.W.; ASTARITA, L.V.; NODARI, R.O. **Somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze.** In – *Somatic embryogenesis in woody plants*, eds. S. Jain, P. Gupta; R. Newton. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, v. 6, p. 457–478, 2000.

GUERRA, M.P.; SILVEIRA, V.; REIS, M.S.; SCHNEIDER, L. **Exploração, manejo e conservação da araucária (*Araucaria angustifolia*).** In: *Sustentável mata atlântica: a exploração de seus recursos florestais*. São Paulo: SENAC, 2002.

GUPTA, P.K.; PULLMAN, G.S. Method for reproducing coniferous plants by somatic embryogenesis using abscisic acid and osmotic potential variation. **US Patent 5,036,007**. 1991.

GUTTERIDGE, J.M.C. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. **Clin. Chem.**, v. 41, n. 12, p. 1819-1828, 1995.

HAKMAN, I. Embryology in Norway spruce (*Picea abies*). An analysis of the composition of seed storage proteins and deposition of storage reserves during seed development and somatic embryogenesis. **Physiol. Plant.**, v. 87, p. 148-159, 1993.

HALLIWELL, B.; CHIRICO, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 57, p. 715S–725S, 1993.

HAMPP, R.; MERTZ, A.; SCHAIBLE, R.; SCHWAIGERER, M.; NEHLS, U. Distinction of *Araucaria angustifolia* seeds from different locations in Brazil by a specific DNA sequence. **Trees**, v. 14, p. 429–434, 2000.



HAVIR, E.A.; MCHALE, N.A. Enhanced-peroxidatic activity in specific catalase isozymes of tobacco, barley, and maize. **Plant Physiol.**, v. 91, p. 812–815, 1989.

HERMES-LIMA, M. **Oxygen in biology and biochemistry**: Role of free radicals. In: *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*. p. 319-368, 2004.

HODGES, D.M.; DELONG, J.M.; FORNEY, C.F.; PRANGE, R.K. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. **Planta**, v. 207, p. 604–611, 1999.

HOEBERICHTS, F.A.; WOLTERING, E.J. Multiple mediators of plant programmed cell death: interplay of conserved cell death mechanisms and plant-specific regulators. **BioEssays**, v. 25, p. 47–57, 2003.

HUANG, C.N.; CORNEJO, M.J.; BUSH, D.S.; JONES, R.L. Estimating viability of plant protoplasts using double and single staining. **Protoplasma**, v. 135, p. 80-87, 1986.

HUNG, S.; YU, C.; LIN, C.H. Hydrogen peroxide functions as a stress signal in plants. **Bot. Bull. Acad. Sin.**, v. 46, p. 1-10, 2005.

ITO, K. Isolation of two distinct cold-inducible cDNAs encoding plant uncoupling proteins from the spadix of skunk cabbage (*Symplocarpus foetidus*). **Plant Science**, v. 149, p. 167–173, 1999.

JABS, T. Reactive oxygen intermediates as mediators of programmed cell death in plants and animals. **Biochem. Pharmacol.**, v. 57, n. 3, p. 231–245, 1999.

JACKSON, C.; DENCH, J.E.; HALL, D.O.; MOORE, A.L. Separation of mitochondria from contaminating subcellular structures utilizing silica sol gradient centrifugation. **Plant Physiol.**, v. 64, p. 150-153, 1979.

JEZEK, P.; COSTA, A.D.; VERCEIS, A.E. Reconstituted plant uncoupling mitochondrial protein allows for proton translocation via fatty acid cycling mechanism. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 24272–24278, 1997.

JONES, K.H.; SENFT, J.A. An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 33, n. 1, p. 77-79, 1985.

JUÁREZ, O.; GUERRA, G.; MARTINEZ, F.; PARDO, J.P. The mitochondrial respiratory chain of *Ustilago maydis*. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1658, p. 244–251, 2004.

KEEGSTRA, K.; THOMASHOW, M. Adapting physiology and metabolism to changes in the environment. **Curr. Opi. Plant Biol.**, v. 5, p. 191–192, 2002.

KERSCHER, S.J. Diversity and origin of alternative NADH:ubiquinone oxidoreductases. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1459, p. 274-283, 2000.

KLIEBENSTEIN, D.J.; DIETRICH, R.A.; MARTIN, A.C.; LAST, R.L.; DANGL, J.L. LSD1 regulates salicylic acid induction of copper zinc superoxide dismutase in *Arabidopsis thaliana*. **Mol. Plant-Microbe Interact.**, v. 12, p. 1022–1026, 1999.

KLINGENBERG, M. Mechanism and evolution of the uncoupling protein of brown adipose tissue. **TRENDS Biochem. Sci.**, v. 15, p. 108–112, 1990.

KOWALTOWSKI, A.J.; COSTA, A.D.T.; VERCESI, A.E. Activation of the potato plant uncoupling mitochondrial protein inhibits reactive oxygen species generation by the respiratory chain. **FEBS Let.**, v. 425, p. 213–216, 1998.

KOWALTOWSKI, A.J.; VERCESI, A.E. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. **Free Rad. Biol. and Med.**, v. 26, p. 463-471, 1999.

KUCERA, B.; COHN, A.; LEUBNER-METZGER, G. Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. **Seed Sci. Res.**, v. 15, p. 281–307, 2005.

KUK, Y.I.; SHIN, J.S.; BURGOS, N.R.; HWANG, T.E.; HAN, O.; CHO, B.H.; JUNG, S.Y.; GUH, J.O. Antioxidative enzymes offer protection from chilling damage in rice plants. **Crop. Sci.**, v. 43, p. 2109-2117, 2003.

KUMAR, A.M.; SOLL, D. Arabidopsis alternative oxidase sustains *Escherichia coli* respiration. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 89, p. 10842-10846, 1992.

KUZNIAK E.; SKLODOWSKA, M. The effect of botrytis cinerea infection on the antioxidant profile of mitochondria from tomato leaves. **J. Exp. Bot.**, v. 55, p. 605–612, 2004.

KWAK, J.M.; NGUYEN, V.; SCHROEDER, J.I. The role of reactive oxygen species in hormonal responses. **Plant Physiol.**, v. 141, p. 323–329, 2006.

LALOI, M.; KLEIN, M.; RIESMEIER, J.W.; MULLER-ROBER, B.; FLEURY, C.; BOUILLAUD, F.; RICQUIER, D. A plant cold-induced uncoupling protein. **Nature**, v. 389, p. 135–136, 1997.

LAMBOWITZ, A.M.; SABOURIN, J.R.; BERTRAND, H.; NICKELS, R.; McINTOSH, L. Immunological identification of the alternative oxidase of *Neurospora crassa* mitochondria. **Mol. Cell. Biol.**, v. 9, p. 1362-1364, 1989.

LENNON A.M.; NEUENSCHWANDER U.H.; RIBAS-CARBO M.; GILES, L.; RYALS, J.A.; SIEDOW, J.N. The effects of salicylic acid and tobacco mosaic virus infection on the alternative oxidase of tobacco. **Plant Physiol.**, v. 115, p. 783-791, 1997.

LEVINE, A.; TENHAKEN, R.; DIXON, R.; LAMB, C. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. **Cell**, v. 79, p. 583-593, 1994.

LOBO, D.H. Araucária: necessidade de conservação e recomposição da Araucária. **Florestar Estatístico**, v. 6, p. 10-11, 2003.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.C.; RANDAL, R.J. Protein measurement with the folinphenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

LU, P.; SANG, W.; MA, K. Activity of stress-related antioxidative enzymes in the invasive plant crofton weed (*Eupatorium adenophorum*). **J. Integrative Plant Biol.**, v. 49, n. 11, p. 1555–1564, 2007.

LUETHY, M.H.; KNUDTEN, A.F.; ELTHON, T.E. **The NAD(P)H dehydrogenases of plant mitochondria.** In *Molecular, Biochemical and Physiological Aspects of Plant Respiration*, ed. H Lambers, LHW van der Plas, pp. 29–35. The Hague, The Netherlands: SPB Academic, 1992.

MACEDO, E.S.; CARDOSO, H.G.; HERNANDEZ, A.; PEIXE, A.A.; POLIDOROS, A.; FERREIRA, A.; CORDEIRO, A.; ARNHOLDT-SCHMITTA, B. Physiologic responses and gene diversity indicate olive alternative oxidase as a potential source for markers involved in efficient adventitious root induction. **Physiol. Plant.**, v. 137, p. 532–552, 2009.

MAIA, I.G.; BENEDITTI, C.E.; LEITE, A.; TURCINELLI, S.R.; VERCESI, A.E. AtPUMP: An *Arabidopsis* gene encoding a plant uncoupling mitochondrial protein. **FEBS Let.**, v. 429, p. 403–406, 1998.

MARIANO, A.B.; KOVALHUK, L.; VALENTE, C.; MAURER-MENESTRINA, J.; PEREIRA-NETTO, A.B.; GUERRA, M.P.; CARNIERI, E.G.S. Improved method for isolation of coupled mitochondria of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v. 47, n. 6, p. 873–879, 2004.

MARIANO, A.B.; VALENTE, C.; MAURER, J.B.B.; CADENA, S.M.S.C.; ROCHA, M.E.M.; OLIVEIRA, M.B.M.; SALGADO, I.; CARNIERI, E.G.S. Functional characterization of mitochondria isolated from the ancient gymnosperm *Araucaria angustifolia*. **Plant Sci.**, v. 175, p. 701–705, 2008.

MARTINS, I.S.; CARNIERI, E.G.S.; VERCESI, A.E. Mechanisms of  $\text{Ca}^{2+}$  and anion transport across the inner membrane of plant mitochondria. **Curr. Topics Plant Physiol.**, v. 1, p. 211-217, 1993.

MATTOS, J.R. O pinheiro brasileiro, **Artes Gráficas Princesa LTDA**, v. 1, 2<sup>o</sup> ed., p. 225, 1994.

MAURER, J.B.B.; PEREIRA-NETTO, A.B.; PETTOLINO, F.A.; GASPAR, Y.M.; BACIC, A. Effects of Yariv dyes, arabinogalactan-protein binding reagents, on the growth and viability of Brazilian pine suspension culture cells. **Trees-Struct Funct.**, v. 24, p. 391-398, 2010a.

MAURER, J.B.B.; BACIC, A.; PEREIRA-NETTO, A.B.; DONATTI, L.; ZAWADZKI-BAGGIO, S.F.; PETTOLINO, F.A. Arabinogalactan-proteins from cell suspension cultures of *Araucaria angustifolia*. **Phytochemistry**, v. 7, p. 1400–1409, 2010b.

MAXWELL, D.P.; WANG, Y.; MCINTOSH, L. The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. **Proc. Nat. Acad. Sci.** v. 96, p. 8271-8276, 1999.

MAXWELL, D.P.; NICKELS, R.; MCINTOSH, L. Evidence of mitochondrial involvement in the transduction of signals required for the induction of genes associated with pathogen attack and senescence. **Plant J.**, v. 29, p. 269–279, 2002.

McCABE, P.F.; LEAVER, C.J. Programmed cell death in cell cultures. **Plant Mol. Biol.**, v. 44, p. 359–368, 2000.

McDONALD, A.E. Alternative oxidase: what information can protein sequence comparisons give us? **Physiol. Plant.**, v. 137, p. 328–341, 2009.

McINTOSH, L. Molecular biology of the alternative oxidase. **Plant Physiol.**, v. 105, p. 781–786, 1994.

MELO, A.M.P., ROBERTS, T.H., MØLLER, I.M. Evidence for the presence of two rotenone-insensitive NAD(P)H dehydrogenases on the inner surface of the inner membrane of potato tuber mitochondria. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1276, p. 133–139, 1996.

MEEUSE, B.J.D. Thermogenic respiration in aroids. **Annu Rev. Plant Physiol.**, v. 26, p. 117-126, 1975.

MICKALECKA, A.M.; SVENSSON, A.S.; JOHANSSON, F.I.; AGIUS, S.C.; JOHANSSON, U.; BRENNICKE, A.; BINDER, S.; RASMUSSEN, A.G. *Arabidopsis* genes encoding mitochondrial type II NAD(P)H dehydrogenases have different evolutionary origin and show distinct responses to light. **Plant Physiol.**, v. 133, p. 642-652, 2003.

MICHALECKA, A.M.; AGIUS, S.C.; MØLLER, I.M.; RASMUSSEN, A.G. Identification of a mitochondrial external NADPH dehydrogenase by overexpression in transgenic *Nicotiana sylvestris*. **Plant J.**, v. 37, p. 415-425, 2004.

MILLAR, A.H.; HOEFNAGEL, M.H.N.; DAY, D.A.; WISKICH, J.T. Specificity of the organic acid activation of alternative oxidase in plant mitochondria. **Plant Physiol.**, v. 111, p. 613-618, 1996.

MILLAR, H; CONSIDINE, M.J.; DAY, D.A.; WHELAN, J. Unraveling the role of mitochondria during oxidative stress in plants. **IUBMB Lif.**, v. 51, p. 201–205, 2001.

MILLAR, A.H.; LIDDELL, A.; LEAVER, C.J. Isolation and subfractionation of mitochondria from plants. **Methods Cell Biol.**, Academic Press, 2207, v. 80; Chapter 3. 2001.

MINAGAWA, N.; YOSHIMOTO, A. The induction of cyanide-resistant respiration in *Hansenula anomala*. **J. Biochem.**, v. 101, p. 1141-1146, 1987.

MITTLER, R.; HERR, E.H.; ORVAR, B.L.; VAN CAMP, W.; WILLEKENS, H.; INZE, D.; ELLIS, B.E. Transgenic tobacco plants with reduced capability to detoxify reactive oxygen intermediates are hyperresponsive to pathogen infection. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 96, p. 14165-14170, 1999.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **TRENDS Plant Sci.**, v. 7, n. 9, p. 405-410, 2002.

MITTLER, R.; VANDERAUWERA, S.; GOLLERY, M.; VAN BREUSEGEM, F. Reactive oxygen gene network of plants. **TRENDS Plant Sci.**, v. 9, p. 490–98, 2004.

MITTOVA, V.; GUY, M.; TAL, M.; VOLOKITA, M. Salinity up-regulates the antioxidative system in root mitochondria and peroxisomes of the wild salt-tolerant tomato species *Lycopersicon pennellii*. **J. Exp. Bot.**, v. 55, p. 1105-1113, 2004.

MØLLER, I.M. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NAD(P)H turnover, and metabolism of reactive oxygen species. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v. 52, p. 561-591, 2001.

MØLLER, I.M.; KRISTENSEN, B.K. Protein oxidation in plant mitochondria as a stress indicator. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v. 3, p. 730-735, 2004.

MØLLER, I.M.; JENSEN, P.E.; HANSSON, A. Oxidative modifications to cellular components in plants. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 58, p. 459–8, 2007.

MOORE, C.S.; COOK-JOHNSON, R.J.; RUDHE, C.; WHELAN, J.; DAY, D.A.; WISKICH, J.T.; SOOLE, K.L. Identification of *AtNDI1*, an internal non-phosphorylating NAD(P)H dehydrogenase in *Arabidopsis* mitochondria. **Plant Physiol.**, v. 133, p. 1968-1978, 2003.

MURPHY, M.P.; ECHTAY, K.S.; BLAIKIE, F.H.; ASIN-CAYUELA, J.; COCHEME, H.M.; GREEN, K.; BUCKINGHAM, J.; TAYLOR, E.R.; HURRELL, F.; HUGHES, G.; MIWA, S.; COOPER, C.E.; SVISTUNENKO, D.A.; SMITH, R.A.; BRAND, M.D. Superoxide activates uncoupling proteins by generating carbon-centered radicals and initiating lipid peroxidation. **Biol. Chem.**, v. 278, p. 48534–48545, 2003.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiol.** v. 22, p. 867-880, 1981.

NANTES, I.L.; FAGIAN, M.M.; CATISTI, R.; ARRUDA, P.; MAIA, I.G.; VERCESI, A.E. Low temperature and aging-promoter expression of PUMP in potato tuber mitochondria. **FEBS Let.**, v. 457, p. 103-106, 1999.

NAVROT, N.; ROUHIER, N.; GELHAYE, E.; JACQUOT, J.P. Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria. **Physiol. Plant.**, v. 129, p. 185 - 195, 2007.

NICHOLLS, D.G.; RIAL, E. A history of the first uncoupling protein, UCP1. **J. Bionerg. Biomembr.**, v. 31, p. 399-418, 1999.

NISRA, H.P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the auto-oxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **J. Biol. Chem.** v. 247, p. 3170-3175, 1972.



NOCTOR, G.; FOYER, C.H. Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v. 49, p. 249–279, 1998.

NOGUEIRA, F.T.S.; ROSA JR., V.E.; MENOSSI, M.; ULIAN, E.C.; ARRUDA, P. RNA expression profiles and data mining of sugarcane response to low temperature. **Plant Physiol.**, v. 132, p. 1811-1824, 2003.

NOGUEIRA, F.T.S. **Identificação e caracterização de genes expressos em resposta ao estresse por baixas temperaturas em cana-de-açúcar.** Campinas, 2004. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.

NOGUEIRA, F.T.S.; SASSAKI, F.T.; MAIA, I.G. *Arabidopsis thaliana* uncoupling proteins (AtUCPs): insights into gene expression during development and stress response and epigenetic regulation. **J. Bioenerg. Biomembr.**, v. 43, p. 71–79, 2011.

PALMA, J.M.; JIMÉNEZ, A.; SANDALIO, L.M.; CORPAS, F.J.; LUNDQVIST, M.; GÓMEZ, M.; SEVILLA, F.; DEL RÍO, L.A. Antioxidative enzymes from chloroplasts, mitochondria, and peroxisomes during leaf senescence of nodulated pea plants. **J. Exp. Bot.**, v. 57, n. 8, p. 1747–1758, 2006.

PASTORE, D.; FRATIANNI, A.; PEDE, S.; PASSARELLA, S. Effects of fatty acids, nucleotides and reactive oxygen species on durum wheat mitochondria. **FEBS Let.**, v. 470, p. 88–92, 2000.

PASTORE D.; TRONO D.; LAUS M.N.; DI FONZO N. ; PASSARELLA S. Possible plant mitochondria involvement in cell adaptation to drought stress. A case study: *durum wheat* mitochondria. **J. Exp. Bot.**, v. 58, n. 2, p. 195-210, 2007.

PAVENTI, G.; PASTORE, D.; BOBBA, A.; PIZZUTO, R.; DI PEDE, S.; PASSARELLA, S. Plant uncoupling protein in mitochondria from aged –

dehydrated slices of Jerusalem artichoke tubers become sensitive to superoxide and to hydrogen peroxide without increase in protein level. **Biochimie.**, v. 88, p. 179–188, 2006.

PIERUZZI, F.P.; DIAS, L.L.C.; BALBUENA, T.S.; SANTA-CATARINA, C.; SANTOS, A.L.W.; FLOH, E.I.S. Polyamines, IAA and ABA during germination in two recalcitrant seeds: *Araucaria angustifolia* (Gymnosperm) and *Ocotea odorifera* (Angiosperm). **Annals Bot.**, v. 108, p. 337–345, 2011.

PINHEIRO, H.A.; BORGES, R.; SILVA, M.A.P.; CENTENO, D.C. Activity of alternative oxidase and plant uncoupling mitochondrial protein in potato tubers stored at low temperature or submitted to artificial aging. **Braz. J. Plant Physiol.**, v. 16, n. 2, p. 69–76, 2004.

POLIDOROS, A.N.; MYLONA, P.V.; ARNHOLDT-SCHMITT, B. Aox gene structure, transcript variation and expression in plants. **Physiol. Plant.**, v. 137, p. 342–353. 2009.

PRASAD, T.K.; ANDERSON, M.D.; MARTIN, B.A.; STEWART, C.R. Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. **Plant Cell**, v. 6, p. 65-74, 1994.

PURVIS, A. The role of adaptive enzymes in carbohydrate oxidation by stressed and senescing plant tissues. **Hort-Science**, v. 32, p. 1165-1168, 1997.

PUNTARULO, S.; SANCHEZ, R.A.; BOVERIS, A. Hydrogen–peroxide metabolism in soybean embryonic axes at the onset of germination. **Plant Physiol.**, v. 86, n. 2, p. 626–630, 1988.

RADOJEVIC, L.; ÄLVAREZ, C.; FRAGA, M.F.; RODRÍGUEZ, R. Somatic embryogenic tissue establishment from mature *Pinus nigra* Arn. *Ssp. Salzmannii* embryos. **In Vitro Cell Dev. Biol. Plant.**, v. 35, p. 206–209, 1999.

RASMUSSEN, A.G.; SOOLE, K.L.; ELTHON, T.E. Alternative NAD(P)H dehydrogenases of plant mitochondria. **Annu. Rev. Plant. Biol.**, v. 55, p. 23-39, 2004.

RASMUSSEN, A.G.; GEISLER, D.A.; MØLLER, I.M. The multiplicity of dehydrogenases in the electron transport chain of plant mitochondria. **Mitochondrion**, v. 8, n. 1, p. 47-60, 2008.

RASMUSSEN, A.G.; FERNIE, A.R.; DONGEN, J.T. Alternative oxidase: a defence against metabolic fluctuations? **Physiol. Plant.**, v. 137, p. 371–382, 2009.

REDDY, A.R.; CHAITANYA, K.V.; VIVEKANANDAN, M. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. **J. Plant Physiol.**, v. 161, p. 1189-1202, 2004.

REITZ, R; KLEIN, R.M.; REIS, A. **Projeto madeira de Santa Catarina**. Separata 28 de Sellowia – Herbário Barbosa Rodrigues, Itajai, 1978.

RICQUIER, D.; BOUILLAUD, F. The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP. **Biochem. J.**, v. 345, p. 161-179, 2000.

RHOADS, D.M.; McINTOSH, I. Isolation and characterization of a cDNA clone encoding an alternative oxidase protein of *Sauromatum guttatum* (Schott). **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 88, p. 2122-2126, 1991.

RHOADS, D.M.; UMBACH, A.L.; SWEET, C.R.; LENNON, A.M.; RAUCH, G.S.; SIEDOW, J.N. Regulation of the cyanide-resistant alternative oxidase of plant mitochondria: Identification of the cysteine residue involved in  $\alpha$ -keto acid stimulation and intersubunit disulfide bond formation. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 46, p. 30750–30756, 1998.

RHOADS, D.M.; UMBACH, A.L.; SUBBAIAH, C.C.; SIEDOW, J.N. Mitochondrial reactive oxygen species. Contribution to oxidative stress and interorganellar signaling. **Plant Physiol.**, v. 141, p. 357–366, 2006.

RODRIGUEZ, M.C.S.; PETERSEN, M.; MUNDY, J. Mitogen-activated protein kinase signaling in plants. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 61, p. 621–49, 2010.

SAISHO, D.; NAMBARA, E.; NAITO, S.; TSUTSUMI, N.; HIRAI, A.; NAKAZONO, M. Characterization of the gene family for alternative oxidase from *Arabidopsis thaliana*. **Plant Mol. Biol.**, v. 35, p. 585–596, 1997.

SANTOS, A.L.W.; SILVEIRA, V.; STEINER, N.; VIDOR, M.; GUERRA, M.P. Somatic embryogenesis in Parana pine (*Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze). **Braz. Arch. Biol. Tech.**, v. 45, p. 97–106, 2002.

SANTOS, A.L.W.; WIETHOLTER, N.; GUEDDARI, N.E.; MOERSCHBACHER, B.M. Protein expression during seed development in *Araucaria angustifolia*: transient accumulation of class IV chitinases and arabinogalactan proteins. **Physiol. Plant.**, v. 127, p. 138–148, 2006.

SANTOS, A.L.W.; GUEDDARI, N.E.; TROMBOTTO, S.; MOERSCHBACHER, B.M. Partially acetylated chitosan oligo- and polymers induce an oxidative burst in suspension culture cells of the gymnosperm *Araucaria angustifolia*. **Biomacromolecules**, v. 9, p. 3411-3415, 2008.

SANTOS, A.L.W.; SILVEIRA, V.; STEINER, N.; MARASCHIN, M.; GUERRA, M.P. Biochemical and morphological changes during the growth kinetics of *Araucaria angustifolia* suspension cultures. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v. 53 n. 3. p. 497-504, 2010.

SCANDALIOS, J.G. Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiol.**, v. 101, p. 7-12, 1993.

SCANDALIOS, J.G. **Molecular genetics of superoxide dismutase in plants.** In: Scandalios JG (ed) *Oxidative Stress and Molecular Biology of Antioxidant Defenses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, p. 527-568, 1997.

SCHECKHUBER, C.Q.; HOUTHOOFD, K.; WEIL, A.C.; WERNER, A.; VREESE, A.; VANFLETEREN, J.R.; OSIEWACZ, H.D. Alternative oxidase dependent respiration leads to an increased mitochondrial content in two long-lived mutants of the ageing model *podospora anserine*. **PLoS ONE**, v. 6, n. 1, p. 16620, 2011.

SCHEEREN, L.W.; GEHRARDT, E.J.; FINGER, C.A.G.; LONGHI, S.J.; SCHNEIDER, P.R. Agrupamento de unidades amostrais de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. em função de variáveis do solo, da serapilheira e das acículas, na região de Canela, RS. **Ciência Florestal**, v. 10, n. 2, p. 39-57, 2000.

SCHLÖGL, P.S.; SANTOS, A.L.W.; VIEIRA, L.N.; FLOH, E.I.S.; GUERRA, M.P. Gene expression during early somatic embryogenesis in Brazilian pine (*Araucaria angustifolia* (Bert) O. Ktze). **Plant Cell Tiss. Organ Cult.**, v. 108, p. 173–180, 2012a.

SCHLÖGL, P.S.; SANTOS, A.L.W.; VIEIRA, L.N.; FLOH, E.I.S.; GUERRA, M.P. Cloning and expression of embryogenesis-regulating genes in *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze (Brazilian Pine). **Genet. Mol. Biol.**, v. 35, n. 1, p. 172-181, 2012b.

SCHWARZLÄNDER, M.; FRICKER, M.D.; SWEETLOVE, L.J. Monitoring the in vivo redox state of plant mitochondria: Effect of respiratory inhibitors, abiotic stress and assessment of recovery from oxidative challenge. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1787, p. 468–475, 2009.

SETOGUCHI, H.; OSAWA, T.A.; PINTAUD, J.; JAFFRÉ, T.; VEILLON, J. Phylogenetic relationships within araucariaceae based on rbcL gene sequences. **Am. J. Botany**, v. 85, n. 11, p. 1507, 1998.

SHIMIZU, J.Y.; OLIVEIRA, Y.M.M. Distribuição da variação e usos dos recursos genéticos de araucária no Sul do Brasil. **EMBRAPA-URPFCS**, documento 4, 1981.

SIEDOW, J.N.; BERTHOLD, D.A. The alternative oxidase: a cyanide-resistant respiratory pathway in higher plants. **Plant Physiol.**, v. 66, p. 569-573, 1986.

SIEDOW, J.N.; MOORE, A.L. A kinetic model for the regulation of electron transfer through the cyanide-resistant pathway in plant mitochondria. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1142, p. 165–74, 1993.

SIEDOW J.N.; UMBACH A.L. The mitochondrial cyanide-resistant oxidase: structural conservation amid regulatory diversity. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1459, p. 432-439, 2000.

SIES, H.; KOCH, O.R.; MARTINO, E.; BOVERIS, A. Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol-treated rats. **FEBS Let.**, v. 103, n. 2, p. 287–290, 1979.

SILVA, R.F.; MENENDEZ-YUFFA, A. Viability in protoplasts and cell suspensions of *Coffea arabica* cv. Catimor. **Electron J. Biotechn.**, v. 9, p. 593-597. 2006.

SILVEIRA, V.; STEINER, N.; SANTOS, A.L.W.; NODARI, R.O.; GUERRA, M.P. Biotechnology tools in *Araucaria angustifolia* conservation and improvement: inductive factors affecting somatic embryogenesis. **Crop Breed. Appl. Biot.**, v. 2, n. 3, p. 463-470, 2002.

SILVEIRA, V.; SANTA-CATARINA, C.; TUN, N.N.; SCHERER, G.F.E.; HANDRO, W.; GUERRA, M.P.; FLOH, E.I.S. Polyamine effects on the

endogenous polyamine contents, nitric oxide release, growth and differentiation of embryogenic suspension cultures of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Plant Sci.**, v. 171, p. 91–98, 2006.

SILVEIRA, V.; SANTA-CATARINA, C.; BALBUENA, T.S.; MORAES, F.M.S.; RICART, C.A.O.; SOUSA, M.V.; GUERRA, M.P.; HANDRO, W.; FLOH, E.I.S. Endogenous abscisic acid and protein contents during seed development of *Araucaria angustifolia*. **Biol. Plantarum**, v. 52, n. 1, p. 101-104, 2008.

SIMONS B.H.; MILLENAAR F.F.; MULDER L.; VAN LOON L.C.; LAMBERS H. Enhanced expression and activation of the alternative oxidase during infection of *Arabidopsis* with *Pseudomonas syringae* pv tomato. **Plant Physiol.**, v. 120, p. 529-538, 1999.

SKULACHEV, V.P. Fatty acid circuit as a physiological mechanism of uncoupling of oxidative phosphorylation. **FEBS Let.**, v. 294, p. 158–162, 1991.

SKULACHEV, V.P. Why are mitochondria involved in apoptosis? Permeability transition pores and apoptosis as selective mechanisms to eliminate superoxide-producing mitochondria and cell. **FEBS Let.**, v. 397, p. 7–10, 1996.

SKULACHEV, V.P. Role of uncoupled and non-coupled oxidations in maintenance of safely levels of oxygen and its one-electron reductants. **Quart. Rev. Biophys.**, v. 29, p. 169-202, 1996.

SLUSE, F.E.; ALMEIDA, A.M.; JARMUSZKIEWICZ, W.; VERCESI, A.E. Free fatty acids regulate the uncoupling protein and alternative oxidase activities in plant mitochondria. **FEBS Let.**, v. 433, p. 237-240, 1998.

SLUSE, F.E.; JARMUSZKIEWICZ, W. Activity and functional interaction of alternative oxidase and uncoupling protein in mitochondria from tomato fruit. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 33, p. 259-268, 2000.

SMITH, A.M.O.; RATCLIFFE, R.G.; SWEETLOVE, L.J. Activation and function of mitochondrial uncoupling protein in plants. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 51944–51952, 2004.

SMITH, C.; BARTHET, M.; MELINO, V.; SMITH, P.; DAY, D.; SOOLE, K. Alterations in the mitochondrial alternative NAD(P)H dehydrogenase NDB4 lead to changes in mitochondrial electron transport chain composition, plant growth and response to oxidative stress. **Plant Cell Physiol.**, v. 52, n. 7, p. 1222–1237, 2011.

STEINER, N.; VIEIRA, F.N.; MALDONADO, S.; GUERRA, M.P. Effect of carbon source on morphology and histodifferentiation of *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v. 48, p. 895–903, 2005.

STEINER, N. **Parâmetros fisiológicos e bioquímicos durante a embriogênese zigótica e somática de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze.** Florianópolis, 2005. Dissertação (Mestre em Recursos Genéticos Vegetais) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina.

STEINER, N.; SANTA-CATARINA, C.; SILVEIRA, V.; FLOH, E.I.S.; GUERRA, M.P. Polyamine effects on growth and endogenous hormones levels in *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures. **Plant Cell Tiss. Organ Cult.**, v. 89, p. 55–62, 2007.

STEINER, N. **Embriogênese somática em *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze, *Pinus sylvestris* (Linneaus) e *Picea abies* (Linneaus) Karsten: ontogênese, padrão de expressão protéica e do gene SERK.** Florianópolis, 2009. Tese (Doutora em Recursos Genéticos Vegetais) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina.

TAI, P.Y.P.; LENTINI, R.S. **Freeze damage of florida sugarcane.** In: Sugarcane handbook (Anderson D.L.Ed.), Ed.1. pp.1–3, Florida Cooperative Extension Service, University of Florida, Florida, 1998.



TAIZ, L.; ZEIGER, E. (eds.) **Plant Physiology** (4nd ed.) Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, 2009.

TAKAYANAGI, R.; TAKESHIGE, K.; MINAKAMI, S. NADH and NADPH-dependent lipid peroxidation in bovine heart submitochondrial particles. **Biochem. J.**, v. 192, p. 853-860, 1980.

TAUTORUS, T.E.; FOWKE, L.C.; DUNSTAN, D.I. Somatic embryogenesis in conifers. **Canadian J. Bot.**, v. 69, p. 1873-1899, 1991.

TAYLOR, N.L.; HEAZLEWOOD, J.L.; DAY, D.A.; MILLAR, A.H. Differential impact of environmental stresses on the Pea mitochondrial proteome. **Mol. Cel. Proteomics**, v. 4, n. 8, p. 1122-1133, 2005.

THOMASHOW, M.F. Plan cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** v. 50, p. 571-599, 1999.

TISSERAT, B.; MANTHEY, J.A. In vitro sterile hydroponic culture system to study iron chlorosis. **J. Plant Nutrition**, v. 19, p. 29-143, 1996.

TUDELLA, V.G.; CURTI, C.; SORIANI, F.M.; SANTOS, A.C.; UYEMURA, S.A. In situ evidence of an alternative oxidase and an uncoupling protein in the respiratory chain of *Aspergillus fumigatus*. **Internat. J. of Biochem. Cell Biol.**, v. 36, p. 162–172, 2003.

TSUGANE, K.; KOBAYASHI, K.; NIWA, Y.; OHBA, Y.; WADA, K.; KOBAYASHI, H. A recessive *Arabidopsis* mutant that grows enhanced active oxygen detoxification. **Plant Cell**, v. 11, p. 1195–1206, 1999.

UMBACH, A.L.; SIEDOW, J.N. Covalent and noncovalent dimmers of the cyanide-resistant alternative oxidase protein in higher plant mitochondria and their relationship to enzyme activity. **Plant Physiol.**, v. 103, p. 845–54, 1993.

UMBACH, A.L.; WISKICH, J.T.; SIEDOW, J.N. Regulation of alternative oxidase kinetics by pyruvate and intermolecular disulfide bond redox status in soybean seedling mitochondria. **FEBS Let.**, v. 348, p. 181-184, 1994.

UMBACH, A.L.; GONZALEZ-MELER, M.A.; SWEET, C.R.; SIEDOW, J.N. Activation of the plant alternative oxidase: insights from site-directed mutagenesis. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1554, p. 118–128, 2002.

UYEMURA, A.S.; LUO, S.; VIEIRA, M.; MORENO, S.N.J.; DOCAMPO, R. Oxidative phosphorylation and rotenone – insensitive malate – and NADH – quinone oxidoreductases in *Plasmodium yoelli yoelli* mitochondria *in situ*. **J. Biol. Chem.**, v. 279, n. 1, p. 385–393, 2004.

VALENTE, C., **Caracterização de funções mitocondriais em *Araucaria angustifolia***. Curitiba, 2007. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

VALENTE, C.; PASQUALIM, P.; JACOMASSO, T.; MAURER, J.B.B.; SOUZA, E.M.; MARTINEZ, G.R.; ROCHA, M.E.M.; CARNIERI, E.G.S.; CADENA, S.M.S.C. The involvement of PUMP from mitochondria of *Araucaria angustifolia* embryogenic cells in response to cold stress. **Plant Sci.**, v. 197, p. 84-91, 2012.

VAN AKEN, O.; GIRAUD, E.; CLIFTON, R.; WHELAN, J. Alternative oxidase: a target and regulator of stress responses. **Physiol. Plantarum**, v. 137, p. 354-361, 2009.

VANLERBERGHE, G.C.; MCINTOSH, L. Lower growth temperature increases alternative pathway capacity and alternative oxidase protein in tobacco. **Plant Physiol.**, v. 100, p. 115–119, 1992.

VANLERBERGHE, G.C.; MCINTOSH, L. Mitochondrial electron transport regulation of nuclear gene expression: studies with the alternative oxidase gene of tobacco. **Plant Physiol.**, v. 105: p. 867–874, 1994.

VANLERBERGHE, G.C.; DAY, D.A.; WISKICH, J.T.; VANLERBERGHE, A.E.; MCINTOSH, L. Alternative oxidase activity in tobacco leaf mitochondria: dependence on tricarboxylic acid cycle-mediated redox regulation and pyruvate activation. **Plant Physiol.**, v. 109, p. 353–61, 1995.

VANLERBERGHE G.; MCINTOSH L. Alternative oxidase: from gene to function. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v. 48, p. 703-734, 1997.

VERCESI, A.E.; MARTINS, I.S.; SILVA, M.A.P.; LEITE, H.M.F.; CUCCOVIA, I.M.; CHAIMOVICH, H. PUMPing plants. **Nature**, v. 375, p. 24, 1995.

VERCESI, A.E.; BORECKY, J.; MAIA, I.G.; ARRUDA, P.; CUCCOVIA, I.M.; CHAIMOVICH, H. Plant uncoupling mitochondrial proteins. **Annu Rev. Plant Biol.**, v. 57, p. 383-404, 2006.

VETTORE, A.L.; SILVA, F.R.; KEMPER, E.L.; SOUZA, G.M.; SILVA, A.M. Analysis and functional annotation of an expressed sequence tag collection for tropical crop sugarcane. **Genome Res.**, v. 13, p. 2725–2735, 2003.

VON ARNOLD, S.; ERIKSSON, T. In vitro studies of adventitious shoot formation in *Pinus contorta*. **Canadian J. Bot.**, v. 59, p. 870–874, 1981.

VON ARNOLD, S.; SABALA, I.; BOZHOKOV, P.; DYACHOK, J.; FILONOVA, L. Developmental pathways of somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tiss. Organ Cult.**, v. 69, p. 233–249, 2002.

VRANOVÁ, E.; INZÉ, D.; VAN BREUSEGEM, F. Signal transduction during oxidative stress. **J. Exp. Bot.**, v. 53, n. 372, p. 1227-1236, 2002.

WAGNER, A.M.; Van der BERGEN, C.W.M.; WINCENCJUSZ, H. Stimulation of the alternative pathway by succinate and malate. **Plant Physiol.**, v. 108, p. 1035–1042, 1995.

WAGNER, A.M.; KRAB, K. The alternative respiration pathway in plants: role and regulation. **Plant Physiol.**, v. 95, p. 318–325, 1995.

WAGNER, A.M.; KRAB, K.; WAGNER, M.J.; MOORE, A.L. Regulation of thermogenesis in flowering araceae: the role of the alternative oxidase. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1777, p. 993–1000, 2008.

WANG, J.; RAJAKULENDRAN, N.; AMIRSADEGHI, S.; VANLERBERGHE, G.C. Impact of mitochondrial alternative oxidase expression on the response of *Nicotiana tabacum* to cold temperature. **Physiol. Plant.**, v. 142, p. 339–351, 2011.

WHELAN, J.; MCINTOSH, L.; DAY, D.A. Sequencing of a soybean alternative oxidase cDNA clone. **Plant Physiol.**, v. 103, p. 1481, 1993.

WHELAN, J.; HUGOSSON, M.; GLASER, E.; DAY, D.A. Studies on the import and processing of the alternative oxidase precursor by isolated soybean mitochondria. **Plant Mol. Biol.**, v. 27, p. 769–778, 1995.

WINKLER, E.; KLINGENBERG, M. Effect of fatty acids on H<sup>+</sup> transport activity of the reconstituted uncoupling protein. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 4, p. 2508–2515, 1994.

YAGI, T. Bacterial NADH-quinone oxidoreductases. **J. Bioenerg. Biomembr.**, v. 23, p. 211–225, 1991.

ZANINOTTO, F.; CAMERA, S.L.; POLVERARI, A.; DELLEDONNE, M. Cross talk between reactive nitrogen and oxygen species during the hypersensitive disease resistance response. **Plant Physiol.**, v. 141, p. 379–383, 2006.